



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MODIFIKÁCIE HYALURONANU KYSELINOU CHOLOVOU
A VYUŽITIE TÝCHTO DERIVÁTOV PRE NOSIČOVÉ
APLIKÁCIE**

MODIFICATION OF HYALURONAN BY CHOLIC ACID AND THE USING OF THESE DERIVATIVES FOR
CARRIER APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klaudia Kvaková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1148/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Klaudia Kvaková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Modifikácie hyaluronanu kyselinou cholovou a využitie týchto derivátov pre nosičové aplikácie

Zadání bakalářské práce zadání:

1. Rešerše zameraná na spôsob prípravy amfifilných derivátov hyalurónanu.
2. Optimalizácia syntézy hyalurónanu graftedého kyselinou cholovou, stanovenie stupňa substitúcie a opakovateľnosti reakcii.
3. Štrukturálna charakterizácia produktu pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR), SEC/MALLS a infračervenej spektroskopie.
4. Experimentálne štúdiá - porovnanie účinnosti enkapsulácie a vplyv stupňa substitúcie a molekulovej hmotnosti modifikovaného hyaluronanu.
5. Vyhodnotenie výsledkov a diskusia: Modifikácie hyaluronanu a ich aplikácie ako nosič.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klaudia Kvaková
student(ka)

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Esterifikáciou hydrofilnej kyseliny hyalurónovej (HA) s hydrofóbnou časťou kyseliny cholovej bol pripravený amfifilný derivát. V prvom kroku syntézy došlo k aktivácii karboxylovej skupiny kyseliny cholovej jej reakciou s benzoylchloridom (BC) a trietylamiénom (TEA) v prostredí tetrahydrofuránu (THF). Vzniknutý alifatico-aromatický anhydrid reagoval pri laboratórnej teplote s kyselinou hyalurónovou a trietylamiénom v zmesi vody a tetrahydrofuránu. Reakcia bola katalyzovaná 4-(dimethylamíno)pyridínom (DMAP), jej produktom bol hydrofobizovaný cholát kyseliny hyalurónovej (HA-CA). Štruktúra derivátu bola charakterizovaná pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) a infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FT-IR). Použitím vylučovacej chromatografie (SEC-MALLS) bola zistená molekulová hmotnosť derivátu aj kyseliny hyalurónovej. V prípade týchto látok boli taktiež skúmané ich reologické vlastnosti. Keďže hydrofobizovaný hyaluronan nachádza uplatnenie v nosičových aplikáciách, boli použité chromatografické metódy na zistenie enkapsulačnej účinnosti nepolárnych látok u vybraných derivátov. Na stanovenie veľkosti častíc bola použitá metóda dynamického rozptylu svetla (DLS). Vzniknutý cholát mal očividne vyššiu molekulovú hmotnosť a bol viskóznejší v porovnaní so vstupnou kyselinou hyalurónovou. Derivát teda vo fyziologickom prostredí tvorí agregáty, no stále zostáva vo vode rozpustný. Z výsledkov chromatografickej analýzy vyplýva, že esterifikovaný hyaluronan dokáže viazať do nanoagregátov koenzým Q10 a kurkumín.

Abstract

Amphiphilic biopolymers were synthesised using esterification of hyaluronic acid (HA) and cholic acid as hydrophobic segment. First, step of synthesis involves the activation of cholic acid carboxylic moiety by reaction with benzoylchloride and triethylamine (TEA) using as solvent tetrahydrofuran (THF). The formed mixed aliphatic/aromatic anhydride (intermediate) reacted at room temperature with hyaluronic acid catalysed by 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) and triethylamine and using as solvent water/THF. Hydrophobized product was identified as sodium cholyl hyaluronate (HA-CA) was obtained as product of the reaction. Structure of derivative was characterised by Nuclear magnetic resonance (NMR) and Fourier Transform - Infrared Spectroscopy (FT-IR). Size exclusion chromatography (SEC-MALLS) was used to determine molecular weight of derivative to evaluate any possible degradation of hyaluronan during modification. Rheological properties of these substances were also examined and confirmed non-degradation. The hydrophobized hyaluronic acid properties were evaluated for application as drug delivery system. Therefore, two non-polar compounds were encapsulated (coenzyme Q10 and curcumin). The size of formed polymeric micelles was characterised by dynamic light scattering (DLS).

Kľúčové slová

Kyselina hyalurónová, kyselina cholová, amfifilita, modifikácie, nosiče liečiv

Keywords

Hyaluronic acid, cholic acid, amphiphility, modifications, drug delivery system

KVAKOVÁ, K. *Modifikácie hyaluronanu kyselinou cholovou a využitie týchto derivátov pre nosičové aplikácie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 38 s. Vedúci bakalárskej práce doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc..

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

PodĎakovanie

Týmto by som chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. RNDr. Vladimírovi Velebnému, CSc. za umožnenie výskumu. Ďalej ďakujem konzultantke mojej práce, Glorii Huerta-Angeles, PhD., za odborné vedenie a rady. V neposlednom rade ďakujem rodičom za podporu a umožnenie štúdia.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Kyselina hyalurónová	8
2.1.1	Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti	8
2.1.2	Výskyt v organizme a fyziologická funkcia.....	8
2.1.3	Degradácia v tele	8
2.1.4	Výroba.....	8
2.1.5	Terapeutické využitie	9
2.1.6	Interakcie s receptorom CD44.....	9
2.2	Chemické modifikácie hyalurónanu	9
2.2.1	Modifikácie karboxylovej skupiny.....	10
2.2.2	Modifikácie alkoholovej skupiny.....	10
2.2.3	Modifikácie N-acetylovej skupiny	11
2.3	Kyselina cholová	11
2.4	Príprava amfifilných derivátov HA s analógmi CA	12
2.4.1	Príprava HA-DOCA	12
2.5	Očkovanie HA a bloková kopolymerácia.....	12
2.6	Enkapsulácia.....	12
2.6.1	Polymérna micela	13
2.6.2	Kurkumín	14
2.6.3	Koenzým Q10	14
2.7	Nosiče liečiv na báze HA	15
2.8	Charakterizácia modifikovanej kyseliny hyalurónovej	15
2.8.1	Nukleárna magnetická rezonancia.....	15
2.8.2	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou	17
2.8.3	Vylučovacia chromatografia	17
2.8.4	Reológia	17
2.8.5	Dynamický rozptyl svetla.....	18
2.8.6	Superkritická fluidná chromatografia.....	18
3	Cieľ práce	19
4	Experimentálna časť	20
4.1	Chemikálie použité na syntézu derivátu	20
4.2	Prístroje a pomôcky	20

4.3	Príprava HA očkovanej kyselinou cholovou	20
4.4	NMR	22
4.4.1	1D NMR	22
4.4.2	2D NMR	22
4.5	FT-IR	22
4.6	Stanovenie molekulovej hmotnosti pomocou metódy SEC-MALLS	22
4.7	Reologická analýza	22
4.8	Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS	22
4.9	Stanovenie enkapsulovaného množstva pomocou SFC	23
5	Výsledky a diskusia	24
5.1	Očkovanie kyseliny cholovej na HA	24
5.2	NMR	24
5.2.1	¹ H NMR	24
5.2.2	HSQC	26
5.2.3	DOSY	26
5.3	FT - IR	26
5.4	SEC-MALLS	28
5.5	Reologická analýza	28
5.6	DLS	29
5.7	SFC	29
6	Záver	31
7	Použitá literatúra	32
8	Zoznam použitých skratiek a symbolov	35
9	Zoznam príloh	36
10	Prílohy	37

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová je prírodný polysacharid, ktorý nachádzame naprieč celým telom predovšetkým v extracelulárnej matrix vyšších organizmov, najmä v spojivových tkanivách, koži, synoviálnej tekutine, očnom sklovci, ale je tiež produkovaná niektorými kmeňmi baktérií. Za fyziologických podmienok (pH 7,4) kyselina hyaluronová existuje vo forme polyaniónu, ktorý vzniká v dôsledku ionizácie karboxylových skupín, a preto je často označovaná ako hyalurónan. Hyalurónan má unikátne biologické vlastnosti, je biokompatibilný a biodegradabilný. Vďaka týmto svojim vlastnostiam nachádza využitie v celej rade lekárskech aplikáciách, ako napríklad v oftalmológii. V tkanivách sa hyalurónan za fyziologických podmienok vyskytuje prevažne v polymérnej podobe s vysokou molekulovou hmotnosťou. V štruktúre hyalurónanu je však prítomných viacero funkčných skupín (okrem karboxylových skupín aj hydroxylové skupiny), ktoré sa dajú modifikovať. Pomocou chemických modifikácií je možné pripraviť z natívneho hyalurónanu vhodnejší materiál pre ďalšie aplikácie. Deriváty hyalurónanu majú rôzne využitie, používajú sa napríklad pri vývoji scaffoldov, pre náhradu chrupavky alebo kože, vyrábajú sa z nich kryty rán. Zaujímavou aplikáciou je využitie silno hydrofobizovaného hyalurónanu pre prípravu nosičov nepolárnych látok vo vodnom prostredí. Amfifilný derivát je možné pripraviť esterifikáciou primárnej hydroxylovej skupiny, pričom karboxylové skupiny hyalurónanu zostávajú po reakcii nezmenené. Amfifilné polyméry sú schopné agregovať vo vode v dôsledku pôsobenia hydrofóbných interakcií a vytvárať útvary podobné micelám. Jadro agregátov je tvorené hydrofóbnymi časťami, čím vzniká priestor pre hydrofóbne liečivá, pričom hydrofilná kostra tvorí vonkajšiu plášť obaľujúci hydrofóbne jadro. Tento plášť znižuje kontakt s inaktivujúcimi látkami vo vodnej fáze, a tým chráni enkapsulované liečivo pred inaktiváciou. Aktívne cielenie do miest s výskytom nádoru môže byť dosiahnuté chemickým spojením cielených ligandov s receptormi na povrchu rakovinových buniek, ktoré ho dokážu rozpoznať. Kyselina hyaluronová má možnosť interagovať s transmembránovým receptorom CD44, ktorý sa nachádza v rakovinových bunkách [1].

Táto práca je zameraná na prípravu hydrofobizovaného derivátu hyalurónanu s kyselinou cholovou. Kyselina cholová je jednou z najdôležitejších ľudských žlčových kyselín. V dôsledku prítomnosti hydrofóbných uhlíkovodíkových skupín a hydrofilných hydroxylových skupín vo svojej štruktúre vykazuje dvojaký charakter. Medzi jej vlastnosti patrí okrem amfifility aj chiralita, biokompatibilita a chemická stabilita steroidného jadra.

Výsledkom práce by mal byť cholát kyseliny hyaluronovej schopný enkapsulácie lipofilných substancií, konkrétne koenzýmu Q10 a kurkumínu do nanoagregátov. Enkapsulácia by mala zabezpečiť rozpustnosť týchto látok vo vodnom prostredí. Pripravené deriváty by mohli byť využité v oblasti cieleného transportu a uvoľňovania liečiv vďaka špecifickým interakciám hyalurónanu s bunkovým receptorom CD44.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kyselina hyalurónová

2.1.1 Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti

Kyselina hyalurónová (HA) je v prírode sa vyskytujúci polysacharid, ktorý sa skladá z opakujúcich sa jednotiek β -D-glukurónovej kyseliny (GlcA) a N-acetyl- β -D-glukozamínových jednotiek (GlcNAc) [2]. Jednotky sú medzi sebou viazané striedavými (1 \rightarrow 4)- a (1 \rightarrow 3)- glykozidickými väzbami a vytvárajú lineárny reťazec [3]. Za fyziologických podmienok pH 7,4 dochádza k prednostnej ionizácii karboxylových skupín HA (hodnota pKa karboxylových skupín D-glukurónovej časti je 3-4). HA existuje *in vivo* vo forme polyaniónu označovaného ako hyalurónan. Vo fyziologických roztokoch má HA štruktúru náhodného kĺbka [4]. Za fyziologických podmienok, je hyalurónan veľmi hydrofilný, obklopený vrstvou molekúl vody, ktoré sú viazané vodíkovými väzbami [5].

Za normálnych podmienok je počet opakujúcich sa disacharidických jednotiek v rozmedzí 2 000-25 000, čo odpovedá molekulovej hmotnosti 10^6 až 10^7 Da (molekulová hmotnosť jedného disacharidu je približne 400 Da) [4]. Vzhľadom k vysokým hodnotám molekulovej hmotnosti a silným intermolekulárnym interakciám sú vodné roztoky HA vysoko viskózne a vykazujú nenewtonovské správanie. V alkalických alebo kyslých podmienkach dochádza k hydrolýze reťazca HA. Degradácia v alkalických podmienkach je výraznejšia a rýchlejšia ako v kyslých podmienkach [5].

2.1.2 Výskyt v organizme a fyziologická funkcia

Kyselinu hyalurónovú nájdeme predovšetkým v extracelulárnej matrix (ECM) vyšších organizmov, najmä v spojivových tkanivách, synoviálnej tekutine, očnom sklovci a je produkovaná aj niektorými kmeňmi baktérií [6].

Vďaka svojej vysokej molekulovej hmotnosti a schopnosti udržať vysoké množstvo vody má HA v tele štruktúrnú a hydratačnú funkciu. HA udržiava hydratovaný a stabilný extracelulárny priestor, v ktorom sú organizované bunky a ďalšie komponenty ECM, ako kolagénové a elastínové vlákna. Pôsobí ako lubrikant a tlmič nárazov, najmä v kĺboch. Bolo potvrdené, že HA je tiež zapojená do bunkovej aktivity, vrátane regulácie, migrácie a adhézie. Vysokomolekulárna HA vykazuje anti-angiogénne a anti-zápalové vlastnosti, zatiaľ čo nízkomolekulárne fragmenty (<100 kDa) majú opačnú biologickú aktivitu; sú zápalové, imuno-stimulačné a angiogénne [5].

2.1.3 Degradácia v tele

Je dobre známe, že počas rozpadu HA po injekcii do kože a kĺbov nie je dlhšia ako 24 hodín, pretože HA je prirodzene degradovaná v organizme komplexnými enzymatickými mechanizmami zahŕňajúcimi hyaluronidázy (Hyal). Predpokladá sa, že degradácia HA je vysoko organizovaný a pevne riadený proces pre generovanie fragmentov HA o presne definovanej veľkosti a s požadovanou biologickou funkciou. Hyal-1 a Hyal-2 sú najviac vyskytujúce sa hyaluronidázy. Molekulárne modelovanie ukazuje, že enzýmom Hyal-2 a receptorom CD44 rozpoznávané miesta sú karboxylové skupiny HA. HA môže byť v organizme tiež prirodzene degradovaná [5].

2.1.4 Výroba

HA bola pôvodne izolovaná z hovädzieho sklovca a neskôr z kohútích hrebienkov a ľudskej pupočníkovej šnúry. Pokroky v biotechnológii viedli k vývoju geneticky modifikovaných baktérií produkujúcich vysoké výťažky HA [5]. HA izolovaná z rôznych zdrojov má rovnakú štruktúru. Vysokomolekulárna HA sa získava zo živočíšnych zdrojov, nevýhodou však je možnosť kontaminácie. Dnes je väčšina komerčných produktov odvodených od baktérií rodu

Streptococcus equi. Čoraz väčšie úsilie je zameriavané na produkciu bakteriálnej HA s vysokým výťažkom a nižšími nákladmi na efektívne čistiace techniky. Výskum je zameraný taktiež na prípravu fragmentov HA so špecifickou jednotnou veľkosťou s kontrolovateľnou degradáciou HA o vysokej molekulovej hmotnosti použitím rôznych techník, vrátane kyslej, alkalickéj, ultrazvukovej a tepelnej degradácie. Iný prístup na získanie oligosacharidov HA definovanej dĺžky je ich výroba pomocou chemoenzymatickej syntézy. Táto metóda vedie k tvorbe oligomérov HA s nízkymi hodnotami polydisperzity [7], [5].

2.1.5 Terapeutické využitie

Jedinečné vlastnosti HA viedli k jeho širokému použitiu v medicínskych aplikáciách [5]. HA sa používa pri operáciách sivého zákalu v oftalmológii, pri liečbe osteoartrózy alebo v reumatológii [8]. HA je tiež používaná pri hojení rán, tvorbe obväzov napustených HA. Hyaluronidázy aj HA boli použité tiež ako markery pre rôzne typy rakoviny vzhľadom k ich úlohe pri raste nádoru a proliferácii. V dnešnej dobe je HA skúmaná za účelom distribúcie liečiv. Internalizácia HA bunkami prostredníctvom CD44 receptorov v priebehu jeho enzymatického odbúravania umožňuje intracelulárne dodávanie liečiv konjugáciou na HA alebo zachytením častíc pomocou HA. Bolo preukázané, že takéto systémy dokážu výrazne zlepšiť rozpustnosť liečiva a sú špeciálne študované v oblasti cielenia protirakovinových liekov do nádoru prostredníctvom buniek s nadmerným výskytom receptorov CD44 [5].

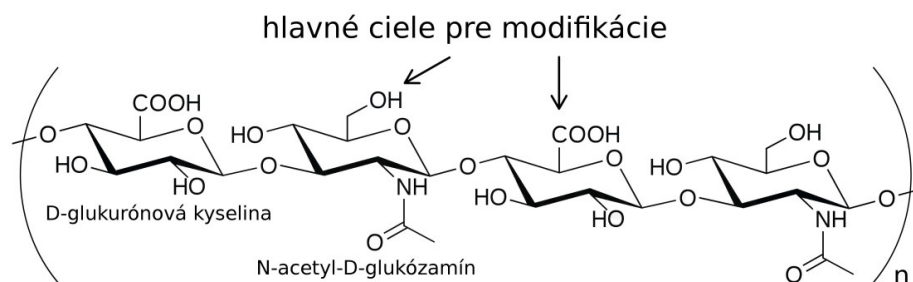
2.1.6 Interakcie s receptorom CD44

Receptor CD44 je glykoproteín, ktorý prechádza cytoplazmatickou membránou, jedným svojim koncom vyčnieva do extracelulárneho priestoru a druhým do intracelulárneho. Časť, ktorá je v extracelulárnom priestore, interaguje s extracelulárnym hyalurónanom, pričom dĺžka fragmentu hrá určitú rolu vo výsledku interakcie. Spomínaný receptor je endocytózneho typu. Pokiaľ teda dôjde k jeho interakcii s fragmentom hyalurónanu, hyalurónan sa dostane do bunky, kde vytvorí špeciálne vakuoly, postupne endozóm a lyzozóm, v ktorých je hyalurónan degradovaný. Takýmto spôsobom je možné aby sa nanočastica (alebo polymérna micela) s naviazanou biologicky aktívnou látkou dostala do bunky [8].

2.2 Chemické modifikácie hyalurónanu

Aj keď sa v tkanivách za fyziologických podmienok hyalurónan vyskytuje prevažne v polymérnej podobe s vysokou molekulovou hmotnosťou, je v tejto podobe prakticky nepoužiteľný. Preto pomocou chemických modifikácií pripravujeme z natívneho biopolyméru vhodnejší materiál pre ďalšie aplikácie.

Univerzálnosť modifikácií spočíva v tom, že výberom typu chemickej väzby, ktorou sa pripája ligand na hyalurónan, stupňom substitúcie a umiestnením ligandu na hyalurónane, sa dá regulovať biokompatibilita, rýchlosť degradácie a hlavne jeho fyzikálne vlastnosti. Chemické modifikácie biopolymérov môžu byť použité všeobecne k pripojeniu akejkoľvek molekuly. Pripojiť teda môžeme biologicky aktívne látky či molekuly zabezpečujúce fyzikálne interakcie medzi molekulami, napr. nosiče na báze hydrofobizovaného hyalurónanu [8]. Štruktúru HA a skupiny, ktoré je možné modifikovať zobrazuje Obrázok 1.



Obrázok 1 Štruktúra kyseliny hyalurónovej

2.2.1 Modifikácie karboxylovej skupiny

Amidácia karboimidmi vo vodnom prostredí je široko využívanou metódou na modifikáciu kyseliny hyalurónovej. Najčastejšie používaným karboimidom je 1-etyl-3-[3-(dimetylamino)-propyl] karbodiimid (EDC). Stupeň substitúcie pripravených derivátov je cca 40 %. V prvom kroku amidácie dochádza k aktivácii karboxylovej skupiny HA použitím EDC, pričom vzniká O-acylizomočovina ako medziprodukt. V druhom kroku nastáva nukleofilný atak amínu na aktivovanú HA, čo vedie k tvorbe amidovej väzby. Reakcia vysoko závisí na pH. Optimálne pH pre oba kroky je odlišné. Aktivácia pomocou EDC najlepšie prebieha v kyslom prostredí, tvorba amidu pri vysokom pH, kedy je amín deprotonovaný. Pri vysokom pH však dochádza k hydrolýze EDC, a preto k amidácii nedochádza. Výhodou tejto reakcie je, že môže byť realizovaná vo vode a reaguje natívny hyaurónan bez predchádzajúcej manipulácie. Okrem toho táto metóda nevedie k štiepeniu reťazca, a preto si HA ponecháva cenné viskoelastické vlastnosti súvisiace s vysokou molekulovou hmotnosťou. Podobnú amidáciu je možné uskutočniť aj v prostredí DMSO namiesto vody, vzniknuté produkty majú stupeň substitúcie 60-80 % z čoho vyplýva, že hydrolýza EDC je minimalizovaná. Pri tejto reakcii je ale potrebné HA previesť z natívneho stavu do kyslej formy, kedy je rozpustná v organických rozpúšťadlách [5].

Amidačná reakcia za použitia 2-chlór-1-metylpyridiniumjodidu (CMPI) ako aktivačného činidla karboxylových skupín HA prebieha v dimetylformamide (DMF), ktorý je bezvodým rozpúšťadlom a minimalizuje hydrolýzu CMPI. Hyalurónan musí byť najprv premenený na tetrabutylamóniovú soľ (TBA), čo umožní jeho rozpustnosť v organickom rozpúšťadle. Najprv reaguje CMPI s karboxylovou skupinou HA, tvorí medziprodukt pyridínu a uvoľňujú sa chloridové ióny, ktoré neutralizujú TBA. Nukleofilný diamín napadá aktivované karboxylové skupiny HA a tvorí amidovú väzbu. TEA neutralizuje uvoľnené jodidové ióny. Nevýhodou tejto reakcie je prítomnosť organického rozpúšťadla, v dôsledku čoho produkt vyžaduje dlhú purifikáciu [5].

Amidácia za použitia 2-chlór-dimetoxy-1,3,5-triazínu (CDMT) ako aktivačného činidla karboxylových skupín, sa vykonáva v zmesi rozpúšťadla vody a acetonitrilu (3:2) pre dosiahnutie optimálnej rozpustnosti reakčných zložiek. Najprv CDMT reaguje s karboxylovou skupinou za vzniku medziproduktu CDMT-aktivovanej. N-metylmorfolínium (NMM) je pridaný k zmesi a neutralizuje vytvorené chloridové ióny. CDMT-aktivovaná HA potom reaguje s amínom za vzniku amidovej väzby. Deriváty vzniknuté použitím 2:1 HA:CDMT mali stupeň substitúcie do 25 %, so zvyšujúcim sa množstvom CDMT by mal stupeň substitúcie derivátu rásť [5].

Amidácia HA s aktivačným činidlom 1,1'-karbonyldiimidazolom na HA karboxylové skupiny prebieha v DMSO z HA-TBA soli [9]. Karbonyldiimidazol reaguje s HA za vzniku vysoko reaktívneho medziproduktu, u ktorého rýchlo dochádza k prešmyku do stabilnejšej HA-imidazolovej formy. Tento medziprodukt reaguje s amínom za tvorby amidovej väzby. Vznik imidazolového medziproduktu trvá 12 hodín, potom nasleduje 48 h amidizácia. Pri reakcii sa uvoľňuje len CO₂ a imidazol - zlúčeniny, ktoré sú netoxické (neuvoľňujú sa silné kyseliny) [5].

2.2.2 Modifikácie alkoholovej skupiny

Použitím epoxidov na modifikáciu HA je možná tvorba éterov napr. na zosieťovanie HA pomocou 1,2,3,4-diepoxybutánu. Reakcia prebieha pri teplote 50 °C po dobu 2 hodín, pH 13-14. K zosieťovaniu HA je možné použiť aj butándiol(diglycidyl)éter (BDDE) v 0,25 M roztoku hydroxidu sodného. Reakcia pozostáva z otvárania epoxidového kruhu za vzniku éterovej väzby s hydroxylovou skupinou HA. Keď je HA vystavená vysokým hodnotám pH (pH > 13) epoxidy prednostne reagujú s hydroxylovými skupinami za vzniku éterovej väzby. Avšak, ak je hodnota pH nižšia ako hodnota pKa hydroxylových skupín, je podporený vznik

esterovej väzby. Výhodou syntézy za použitia BDDE je vznik produktov, ktoré nie sú cytotoxické a epoxidové zlúčeniny sú hydrolyzované na jednoduché dioly [5].

Tvorbu esterov HA je možné dosiahnuť použitím oktenyl anhydridu kyseliny jantárovej (OSA), za alkalických podmienok (hodnota pH=9) vo vodnom prostredí. Hydroxylové skupiny HA reagujú s anhydridom za vzniku esterových väzieb. Takýmto spôsobom je možné pripraviť derivát so stupňom substitúcie až 43 %, je však potrebné nechať zreagovať 50krát väčšie množstvo OSA ako HA. Ďalšou možnosťou tvorby esterov HA je použitie acylchloridov na aktiváciu karboxylových skupín zlúčenín. Tieto aktivované zlúčeniny môžu byť očkované na hydroxylové skupiny HA esterovou väzbou. Aktivácia acylchloridmi prebieha s thionyl chloridom pri laboratórnej teplote v organickom rozpúšťadle (DMSO). Ester je možné vytvoriť aj reakciou HA s anhydridom kyseliny metakrylovej. Táto esterifikácia HA prebieha v ľadovej vode po dobu 12 hodín pri pH 8-10 [5].

2.2.3 Modifikácie N-acetylovej skupiny

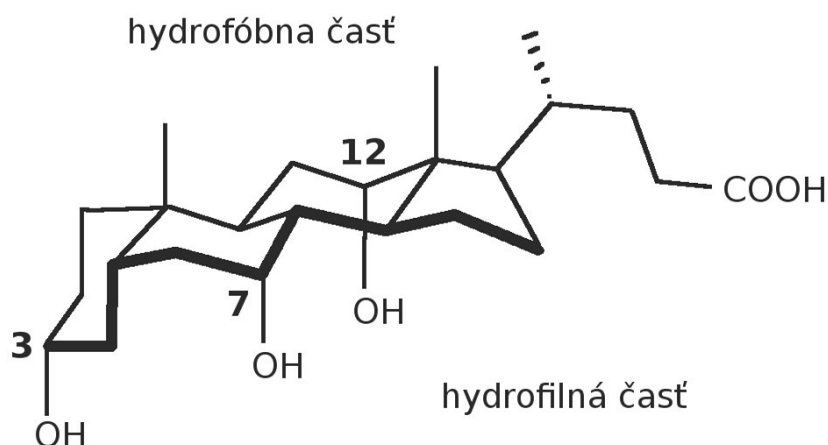
Deacetyláciou N-acetylovej skupiny (-NHCOCH_3) HA je obnovená aminoskupina, ktorá môže reagovať s kyselinou použitím amidácie. Deacetylácia sa zvyčajne vykonáva za použitia hydrazín sulfátu po dobu piatich dní pri teplote 55 °C, čo vyvoláva fragmentáciu reťazca. Dokonca aj miernejšie podmienky spôsobujú degradáciu reťazca v dôsledku eliminácie glukurónovej časti [5].

Reakciou kyseliny s deacetylovanou aminoskupinou HA je možná amidácia tejto skupiny. Kyselina je najprv aktivovaná za použitia karbodiimidu. Deacetylovaný HA amín reaguje s aktivovanou kyselinou a tvorí amidovú väzbu. Takýmto spôsobom je možné sieťovať HA karboxylovými skupinami alginovej kyseliny. Deacetyláciu je možné dosiahnuť použitím enzýmov. Súhrn modifikácii HA je uvedený v tabuľke ako Príloha 1 [5].

2.3 Kyselina cholová

Žľčové kyseliny sú prírodné zlúčeniny, ktoré sú produkované všetkými stavovcami. Ich molekuly sa skladajú z chirálneho, nasýteného steroidného skeletu, ktorý obsahuje jednu alebo viacero hydroxylových skupín, a tiež alifatický reťazec zakončený karboxylovou skupinou [10].

Kyselina cholová (CA), je jednou z najdôležitejších ľudských žľčových kyselín, podiel jej koncentrácie z množstva žľčových kyselín v tele predstavuje viac ako 31 %. Táto koncentrácia je spojená s rakovinou pečene, žľčovými kameňmi a ďalšími chorobami. Normálne rozmedzie koncentrácie CA v pečeni je 1-5 mM a menej ako 10 μM sa nachádza v krvi. CA priťahuje značnú pozornosť predovšetkým vďaka svojej širokej dostupnosti a relatívne nízkej cene. Podobne ako ostatné žľčové kyseliny aj CA vykazuje dvojaké správanie v dôsledku prítomnosti hydrofóbnej časti (β), ktorá obsahuje uhlíkové skupiny a hydrofilnej časti (α) tvorenej hydroxylovými skupinami vo svojej štruktúre. Táto štruktúra je zodpovedná za jej amfifilnú povahu a v dôsledku toho tvorí vo vode, nad kritickou koncentráciou agregáty. Pri tvorbe agregátov hrajú významnú úlohu vodíkové väzby. Vzhľadom na jej amfifilné vlastnosti a schopnosti tvoriť micely, bola CA použitá v oblasti supramolekulárnej chémie na prepravu iónov a polárnych molekúl cez membránu. Taktiež sú skúmané aj syntetické analógy tejto kyseliny [11], [12]. Na rozdiel od iných žľčových kyselín, jedine CA má 3 hydroxylové skupiny, ktoré sa nachádzajú na konkávnej strane molekuly v polohách C3, C7 a C12. Štruktúrny vzorec kyseliny cholovej zobrazuje Obrázok 2. Prítomnosť týchto hydroxylových skupín umožňuje vyššiu rozpustnosť vo vode vzhľadom na ostatné žľčové kyseliny [12].



Obrázok 2 Štruktúra kyseliny cholovej

2.4 Príprava amfifilných derivátov HA s analógmi CA

Amfifilné oligo- a polysacharidy, tiež známe ako hydrofobizované polyméry, sú schopné agregovať vo vode v dôsledku pôsobenia vonkajších alebo vnútorných hydrofóbných interakcií. Keď sú vo vode rozpustené, vytvárajú hydrofóbne domény, ktoré sú schopné rozpúšťať hydrofóbne liečivá [3]. Amfifilné deriváty hyaluronanu zvyčajne vznikajú esterifikáciou hydroxylových skupín, karboxylové skupiny zostávajú nezmenené [2].

2.4.1 Príprava HA-DOCA

Pri príprave nanočastíc konjugátov kyseliny hyaluronovej s kyselinou deoxycholovou (DOCA) najprv dochádza k aktivácii karboxylovej skupiny DOCA. DOCA bola zmiešaná s N,N-dicyklohexylkarboimidom (DCC) a N-hydroxysukcinimidom (NHS) v THF. Koncentrácia DCC pri syntéze je o trochu vyššia ako koncentrácia DOCA, aby došlo k úplnej aktivácii. Reakcia prebieha počas 12 hodín pri laboratórnej teplote v dusíkovej atmosfére, vyzrážaná dicyklohexylmočovina je odstránená filtráciou. K filtrátu je pridané nadmerné množstvo hexánu a zvyškový NHS je v ňom rozpustený. Zrazenina sukcinimidu DOCA bola odfiltrovaná, premytá hexanolom a vysušená [13].

N-deoxycholo-etyléndiamín (DOCA-NH₂) bol syntetizovaný zavedením etyléndiamnu do sukcinimidu DOCA. Sukcinimid DOCA bol rozpustený v DMF a tento roztok bol po kvapkách pomaly pridávaný do roztoku etyléndiamínu. Po 6 h bola zmes zrážaná destilovanou vodou. Zrazenina bola premytá destilovanou vodou a sušená.

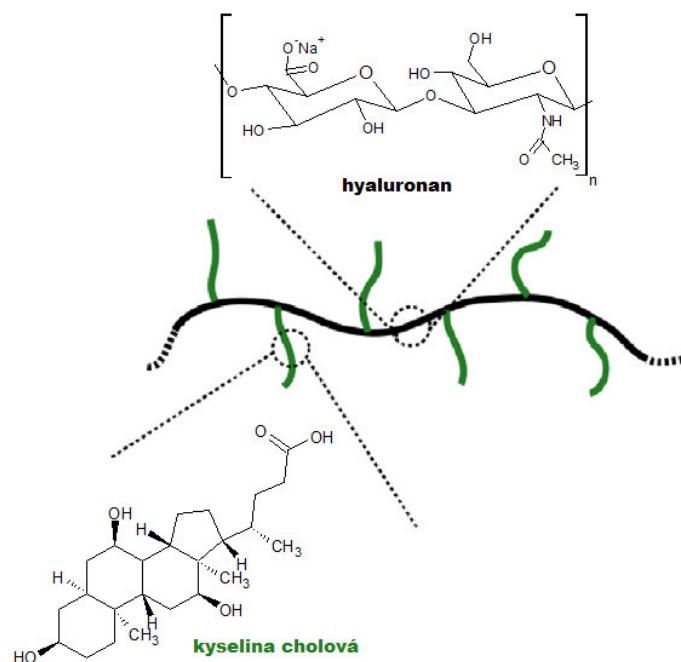
Na prípravu HA-DOCA konjugátov bola HA rozpustená vo formamide za jemného miešania, následne bol do roztoku HA pridaný EDC. DOCA-NH₂ bol pri teplote 50 °C rozpustený v DMF a pridaný k roztoku zmesi HA a EDC [13].

2.5 Očkovanie HA a bloková kopolymerácia

Očkované kopolyméry predstavujú triedu rozvetvených kopolymérov s termodynamicky nekompatibilnými polymérnymi časťami. Vlastnosti týchto polymérov sú podmienené individuálnymi vlastnosťami ich častí [14]. Príkladom očkovaného kopolyméru je aj kopolymér, ktorý znázorňuje Obrázok 3 (HA očkovaný kyselinou cholovou).

2.6 Enkapsulácia

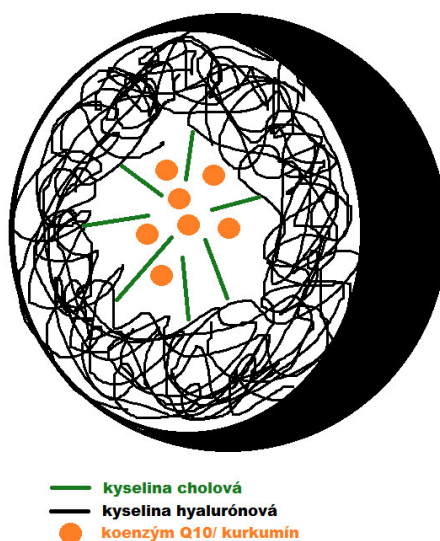
Enkapsulácia (zapúzdrenie) liečiv do nosičov je efektívnym prístupom k zlepšeniu farmakokinetiky liečiv. Schématické znázornenie enkapsulácie zobrazuje Obrázok 4. Polymérne micely zahŕňajú širokú škálu disperzných systémov. Môžu to byť submikrónové emulzie až koloidné častice ako sú polymérne a lipidické nanočastice, micely a lipozómy. Tieto častice sú zamerané na ochranu lieku proti degradácii, alebo reguláciu jeho uvoľňovania, prípadne zvyšovanie komfortu pacienta alebo zníženie vedľajších účinkov [15].



Obrázok 3 Očkováný kopolymér hyalurónanu kyselinou cholovou

2.6.1 Polymérna micela

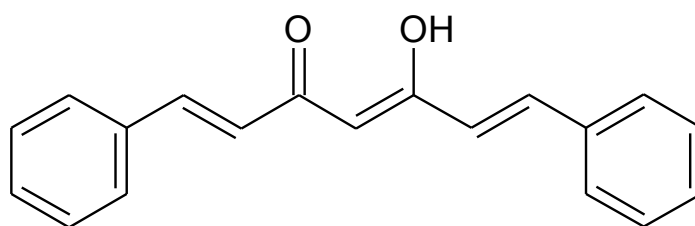
Pre potreby nosičových systémov bolo vyvinuté veľké množstvo rôznych typov nanočastíc. Popredné miesto v skupine nanočasticových nosičov majú polymérne micely, práve vďaka svojim charakteristikám ako je úzka distribúcia veľkostí, morfológia, rozpustnosť málo rozpustných látok, predĺžené uvoľňovanie látok a povrchové vlastnosti, ktoré uprednostňujú ich akumuláciu napr. v nádorovej oblasti. Polymérne micely sú globulárne nanoštruktúry, ktoré sú tvorené amfifílnymi blokovými alebo očkovanými kopolymérmi. Skladajú sa z jadra a obalu [16], [17]. Veľkosť polymérnych micel na báze hyalurónanu sa pohybuje v rozmedzí približne 200-400 nm [18]. Medzi najštudovanejšie blokované kopolyméry tvoriace micely patria polyestery [16].



Obrázok 4 Schématické znázornenie agregátu vo vodnom prostredí

2.6.2 Kurkumín

Kurkumín, 1,7-bis(4-hydroxy-3-metoxifenyl)-1,6-heptadién-3,5-dión, je žltá látka extrahovaná z koreňa byliny *Curcuma longa*. Štruktúrny vzorec kurkumínu zobrazuje Obrázok 5. Vďaka svojej biologickej a farmakologickej aktivite, širokému spektru vlastností (protizápalové, antioxidačné, antimikrobiálne, antitumorigénne, antikoagulačné a antivirotické) priťahuje značnú pozornosť. Kurkumín je navyše netoxický, a teda predstavuje efektívnu alternatívu pre mnoho nových liekov. Avšak väčšina kurkumínu podávaného orálne končí v stolici a moči, menšie množstvá sú detekované v krvnej plazme, k rýchlej degradácii dochádza aj v črevách. Perorálne podanie 10-12 g·ml⁻¹ kurkumínu do ľudského tela vedie k vytvoreniu koncentrácie 50 ng·ml⁻¹ kurkumínu v krvi. Táto koncentrácia nie je dostatočne vysoká na dosiahnutie terapeutického účinku kurkumínu. Nízka biologická dostupnosť kurkumínu je dôsledkom nízkej rozpustnosti vo vode a nestability v nízkych hodnotách pH. S cieľom zlepšenia biologickej aktivity a prekonania týchto obmedzení bolo navrhnutých mnoho metód [19].

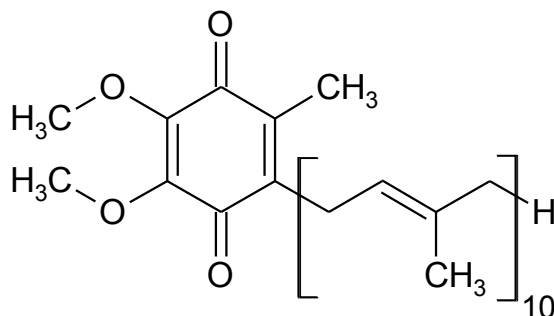


Obrázok 5 Štruktúrny vzorec kurkumínu

2.6.3 Koenzým Q10

Koenzým Q10 je látka rozpustná v tukoch, podobá sa vitamínom a patrí medzi antioxidanty. Nachádza sa v bunkách mnohých organizmov. Jeho funkcia je dobre známa, funguje ako prenášač elektrónov v mitochondriálnom respiračnom reťazci a tým dochádza k uchovávaní energie. Koenzým Q10 (Obrázok 6) je účinný pri inhibícii oxidácie lipidov. Taktiež je dôležitý pri regenerácii vitamínu E.

Táto biomolekula je neoddeliteľnou súčasťou elektrónového transportného reťazca mitochondriálnej membrány, a preto je nevyhnutný pre aeróbny metabolizmus. Má však veľmi nízku biologickú dostupnosť, preto je cieľovou látkou pre využitie stratégie enkapsulácie. Aj keď ľudské telo koenzým Q10 dokáže syntetizovať, existujú rôzne faktory, ktoré znižujú fyziologickú koncentráciu koenzýmu Q10. Nedostatok koenzýmu Q10 bol pozorovaný v bunkách a tkanivách bohatých na mitochondrie, ako sú svaly a nervové tkanivo. Koenzým Q10 môže prispievať k liečbe kardiovaskulárnych ochorení, neurologických porúch, cukrovky, rakoviny, obezity atď. [20].



Obrázok 6 Štruktúrny vzorec koenzýmu Q10

2.7 Nosiče liečiv na báze HA

Zaujímavou aplikáciou je využitie silno hydrofobizovaného hyalurónanu pre prípravu nosičov nepolárnych látok vo vodnom prostredí. Za nefyziologických podmienok sa tvoria z HA rôzne fragmenty, ktoré môžu mať vplyv na bunky. Preto, aby mohli byť bunky signálom ovplyvňované, musia ho rozpoznať. Rozpoznávanie signálu je zabezpečené prostredníctvom receptorov, ktoré sú lokalizované na povrchu buniek a špecificky interagujú len s určitými látkami. Bunky môžu s HA, ktorá sa nachádza v extracelulárnej matrix, interagovať prostredníctvom viacerých receptorov. Najväčšia pozornosť je venovaná receptoru CD44. Zvýšením afinity HA k nepolárnym aktívnym látkam zvýšime ich dostupnosť v rôznych častiach organizmu. Tento transport dosiahneme prostredníctvom vytvárania agregátov, ktoré sú podobné micelám. Takéto agregáty obsahujú hydrofóbne jadro tvorené nepolárnymi časťami na kostre HA vo vodnom médiu. Do nepolárnych častí je možné enkapsulovať bioaktívnu látku (liečivo). Dôvodom použitia HA je tiež prirodzený výskyt v ľudskom organizme a spomínané špecifické interakcie s receptormi bunkového povrchu (CD44), ktoré zvyšujú selektivitu prenosu biologicky aktívnej látky [8].

2.8 Charakterizácia modifikovanej kyseliny hyalurónovej

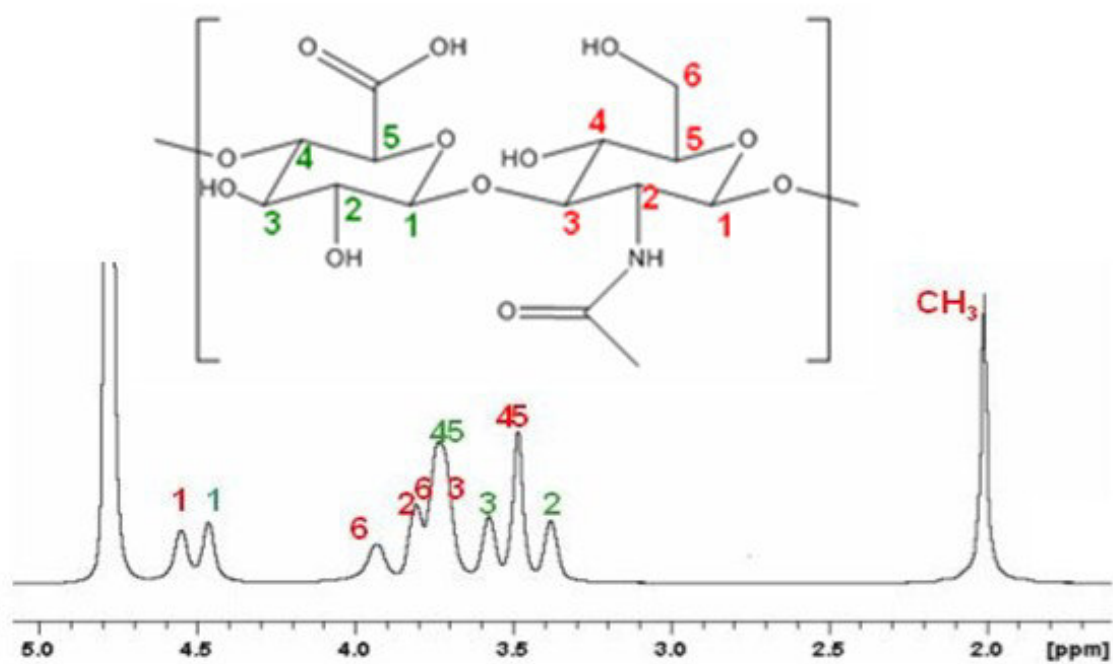
2.8.1 Nukleárna magnetická rezonancia

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) je založená na interakcii magnetických momentov jadier rôznych atómov s magnetickým poľom. Bolo pozorované, že jadrá rovnakého druhu môžu mať mierne odlišné rezonančné frekvencie. Tieto rozdiely vznikajú v dôsledku toho, že jadrá sú obklopené elektrónmi. Keďže sa elektróny pohybujú, v statickom magnetickom poli vytvárajú lokálne magnetické polia orientované opačným smerom ako externé pole, čím sa znižuje magnetické pole jadier. Tieniaci účinok elektrónov, ktorý znižuje rezonančnú frekvenciu jadier, sa mení v závislosti na chemickom prostredí a je charakteristický pre špecifické štruktúrne fragmenty organických zlúčenín a ich substituenty. Pretože tieniaci účinok je priamoúmerný intenzite magnetického poľa, bol zavedený chemický posun nezávislý na magnetickom poli. Hodnoty chemického posunu sa obvykle vyjadrujú v ppm (parts per milion) [21].

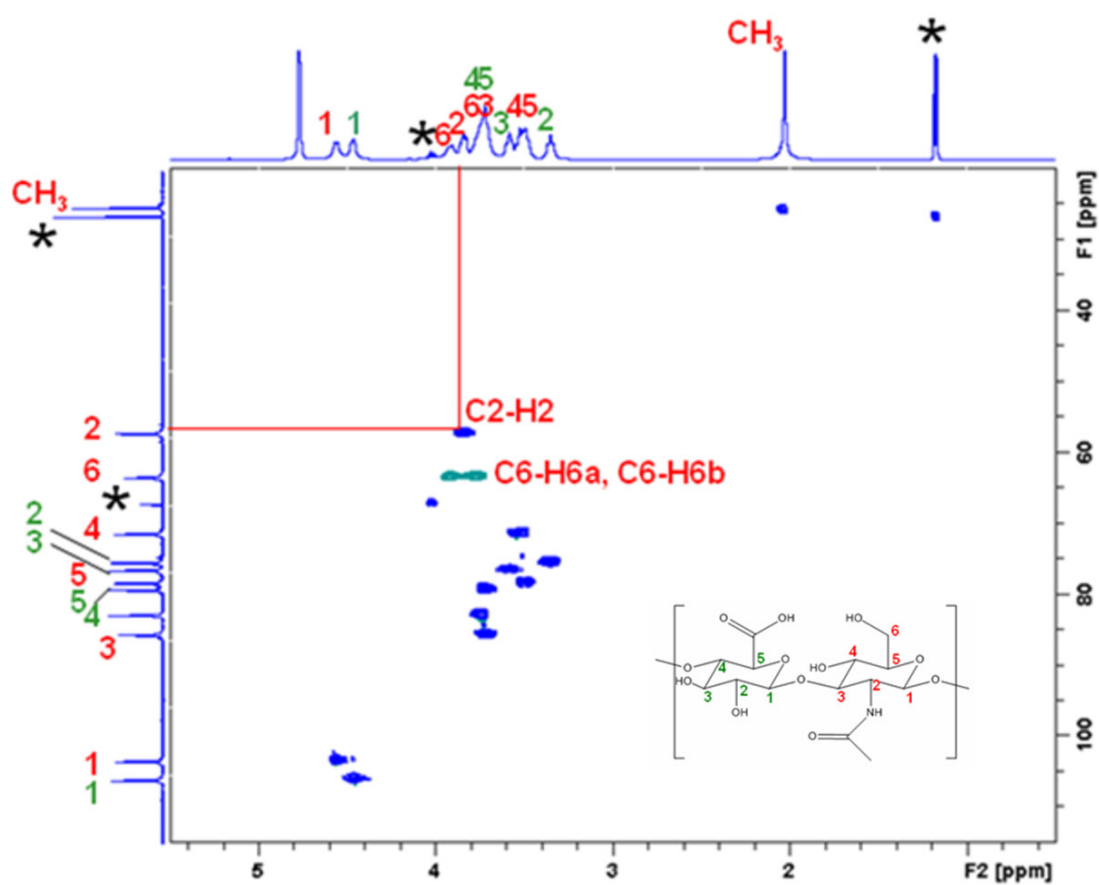
NMR poskytuje informácie o konformačných a štruktúrnych vlastnostiach látok. NMR hrá významnú úlohu pri určovaní čistoty a stupňa substitúcie napr. modifikovanej HA. NMR spektrometria poskytuje rôzne možnosti experimentov. Okrem možnosti použitia rôznych jadier rozlišujeme aj 1D alebo 2D NMR experimenty [22].

Jednodimenziálna NMR spektroskopia je používaná rutinne na charakterizáciu roztokov chemických zlúčenín. NMR spektrá nesú na horizontálnej osi informácie o frekvencii spektrometra (chemický posun) a na vertikálnej osi je uvedená informácia o amplitúde signálu. Informácie, ktoré nám NMR spektrá poskytujú, sú esenciálne pri chemických syntézach napríklad vo farmaceutickom priemysle [23]. ^1H NMR spektrum natívneho HA zobrazuje Obrázok 7.

Dvojdimenziálna 2D NMR spektroskopia rozširuje množstvo informácií o štruktúre zlúčenín v porovnaní s klasickou 1D spektroskopiou. Dvojdimenziálnu NMR spektroskopiou delíme na homonukleárnu a heteronukleárnu. Medzi homonukleárne metódy patrí napr. COSY (Correlation Spectroscopy). Heteronukleárnymi metódami sú napr. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) a DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy). HSQC spektrum zobrazuje vzťah medzi chemickým posunom vodíku ^1H na horizontálnej osi a chemickým posunom uhlíka ^{13}C na vertikálnej osi. Toto spektrum nie je symetrické pozdĺž diagonály. HSQC spektrum natívneho HA zobrazuje Obrázok 8. V prípade DOSY spektier na horizontálnej osi nachádzame chemický posun vodíka ^1H a na vertikálnej osi informáciu o difúznom správaní prostredníctvom difúzneho koeficientu [23].



Obrázok 7 ^1H NMR spektrum natívneho HA



Obrázok 8 HSQC spektrum natívneho HA

2.8.2 Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou

FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) poskytuje informácie o intramolekulárnych vibráciách, v dôsledku čoho je možné analyzovať molekulárnu štruktúru látok. K absorpcii infračerveného žiarenia dochádza pri zmene dipólového momentu, a preto je táto metóda veľmi citlivá na vodu a vodíkové väzby [24]. Rôzne funkčné skupiny absorbujú žiarenie pri špecifických vlnových číslach v infračervenej oblasti (4000 až 400 cm^{-1}). Identifikácia funkčných skupín môže byť použitá pre kontrolu kvality, rutinne sa využíva vo farmaceutickom priemysle. Aj napriek širokému rozsahu aplikácií infračervenej spektroskopie je pre túto metódu typická príprava tabliet pod vysokým tlakom, ktoré obsahujú zmes vzorky a bromidu draselného v pevnom skupenstve [25]. FTIR umožňuje určiť typ väzby, ktorá bola vytvorená počas modifikácie HA [5].

2.8.3 Vylučovacia chromatografia

Zachovanie dĺžky reťazca HA je kritickým bodom pri syntéze derivátov HA, pretože jeho vlastnosti úzko súvisia s viskozitou a molekulovou hmotnosťou [5]. Vylučovacia chromatografia je metóda, ktorá umožňuje separáciu rôznych polymérnych zlúčenín (frakcií) podľa ich molekulovej hmotnosti, stanovenie molekulovej hmotnosti v rozsahu 10^2 - 10^9 Da a výpočet polydispezity [26].

Separácia pomocou vylučovacej chromatografie (SEC) je založená na postupnom vylučovaní molekúl z pórov stacionárnej fázy. Molekuly príliš veľké pre vstup do pórov sú vylúčené a kolónou sa pohybujú rýchlejšie ako molekuly menšie, ktoré prestupujú do pórov. Menšie molekuly sa dostávajú hlbšie do pórov, a teda sú eluované neskôr. V dôsledku toho posledné píky odpovedajú signálom rozpúšťadla vzorky. Pre vylučovaciu chromatografiu je nevyhnutné, aby mobilnou fázou bolo dostatočne silné rozpúšťadlo, čím sa zabráni interakcii medzi analyzovaným polymérom a náplňou, čo by mohlo ohroziť separáciu. Polydisperzné homopolyméry vytvárajú pri elúcii široký pás (zodpovedajúci širokej distribúcii molekulovej hmotnosti), v prípade heterogénnych polymérov a zmesí polymérov sa stretávame so zložitejšími distribúciami [27].

Vylučovacia chromatografia v spojení s detekciou rozptylu svetla (SEC-MALLS) je konvenčná metóda pre stanovenie molekulovej hmotnosti často používaná na analýzu modifikovaných polymérov. Tento typ analýzy spojený s detekciou rozptylu svetla má tú výhodu, že je meraná skutočná molekulárna hmotnosť polyméru. Získané hodnoty nie sú závislé na prípadných zmenách v hydrodynamickej sfére HA, a teda nevedú k falošným výkladom [5].

2.8.4 Reológia

Reológia sa zaoberá mechanickými vlastnosťami hmoty, ktoré určujú jej reakciu na deformáciu a tok. Študované je správanie materiálov, a teda vzťah medzi vplyvom aplikovaných síl a zmenou tvaru. Reologické správanie látok závisí na rôznych fyzikálnych a chemických parametroch. Podľa základných zákonov fyziky (molekulárna fyzika, termodynamika) a chemických vlastností ako sú napríklad molekulová hmotnosť a jej distribúcia, chemická štruktúra, interakcie medzi molekulami atď. je teda možné predpokladať reologické správanie materiálu [28].

Ako bolo vyššie uvedené, roztoky HA sú vysoko viskózne a správajú sa ako nenenewtonovské kvapaliny vzhľadom k vysokej molekulovej hmotnosti HA a výskytu vo forme kĺbka v roztokoch. Reologická analýza je preto nevyhnutná na vyhodnotenie derivatizácie alebo zosieťovania polyméru. Typická krivka dynamickej viskozity roztoku HA ako funkcie šmykovej rýchlosti dokazuje nenenewtonovské vlastnosti HA, pretože zvyšovaním šmykovej rýchlosti dochádza k zníženiu viskozity. U amfifilných polymérov pozorujeme pri vyšších šmykových rýchlostiach oveľa výraznejšiu deformáciu ako u natívneho HA [5].

2.8.5 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS - Dynamic Light Scattering) je jednoduchá neinvazívna technika realizovateľná za laboratórnych podmienok, prostredníctvom ktorej získavame informácie o veľkosti častíc v submikrónovej oblasti. Prichádzajúce laserové žiarenie je rozptýlené časticami v roztoku, detektor meria intenzitu rozptýleného svetla. Intenzita je meraná opakovane počas krátkych intervalov. V priebehu merania intenzita rozptýleného svetla kolíše v dôsledku Brownovho pohybu častíc v kvapalnom médiu. Toto difúzne správanie má za následok kolísanie lokálnej koncentrácie častíc, a preto dochádza ku zmenám interferenčného vzoru rozptýleného žiarenia, čo má za následok zmeny intenzity. Brownov pohyb je závislý na difúznom koeficiente D , fluktuácia intenzity je použitá na určenie hydrodynamickej veľkosti častíc. Väčšie čiastočky sa pohybujú roztokom pomalšie, a preto majú menší difúzny koeficient. DLS určuje difúzny koeficient, ktorý súvisí s polomerom častíc podľa Stokes-Einsteinovho vzťahu:

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D},$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota (v Kelvinoch) a η je dynamická viskozita [29].

2.8.6 Superkritická fluidná chromatografia

Nadkritické tekutiny získavame pri udržiavaní látky nad jej kritickou teplotou a tlakom. Takéto látky sú často považované za ideálne mobilné fáze pre využitie v chromatografii. Superkritická fluidná chromatografia (SFC, označovaná aj ako konvergenčná chromatografia-UPCC/UPC²) je principiálne rovnaká s metódou HPLC (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia). V porovnaní s HPLC má však mnoho výhod ako je napr. krátky čas analýzy, vysoká účinnosť a nízka spotreba organických rozpúšťadiel [30], [31]. Kombinované vlastnosti plynného a kvapalného stavu (napr. vysoká difuzivita a viskozita) teda umožňujú rýchlu a efektívnu separáciu. Pre tieto účely sa dnes používajú takmer výhradne kvapaliny na báze oxidu uhličitého, pretože dosiahnutie nadkritického stavu je jednoduché ($t_k = 31\text{ °C}$ a $p_k = 74\text{ bar}$). Navyše oxid uhličitý je inertný, nehorľavý a lacný. Jeho premena na plyn za normálnych tlakových podmienok je výhodná. Existuje niekoľko aplikácií tejto metódy napríklad analýza vitamínov, mastných kyselín, terpénov, alkaloidov a flavinoidov [30].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce je optimalizácia podmienok syntézy amfifilného derivátu hyalurónanu graftovaného kyselinou cholovou. Súčasťou práce je aj riešenie nasledujúcich čiastkových úloh:

- Štruktúrna charakteristika derivátu pomocou spektrálnych metód NMR a FT-IR.
- Štúdium reológie a SEC-MALLS
- Štúdium enkapsulačnej účinnosti pripravených nosičov a stanovenie veľkosti častíc.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie použité na syntézu derivátu

- Kyselina hyalurónová (HA, $15,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a PDI 1,5) - Contipro
- Kyselina cholová (CA) - TCI
- Trietylamin (TEA) - Penta
- 4-(dimetylamino)-pyridín (DMAP) - Merck
- Benzoyl chlorid (BC) - Merck
- Tetrahydrofurán (THF) - LachNer
- Chlorid sodný - LachNer
- Izopropanol (IPA) - LachNer

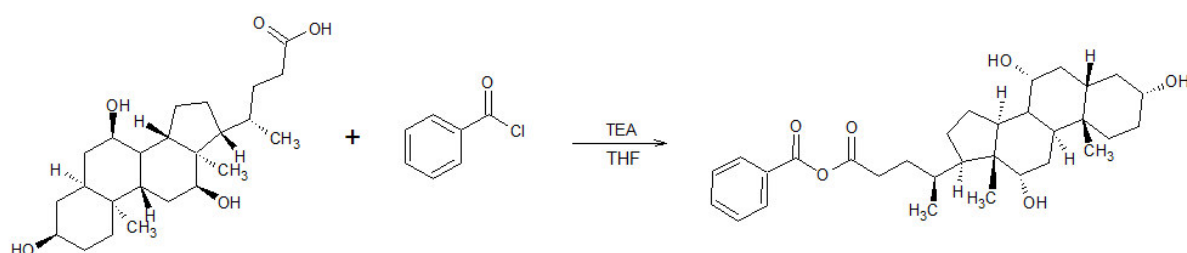
Ďalšie chemikálie použité na analýzu čistoty p.a. boli prevzaté od komerčných dodávateľov.

4.2 Prístroje a pomôcky

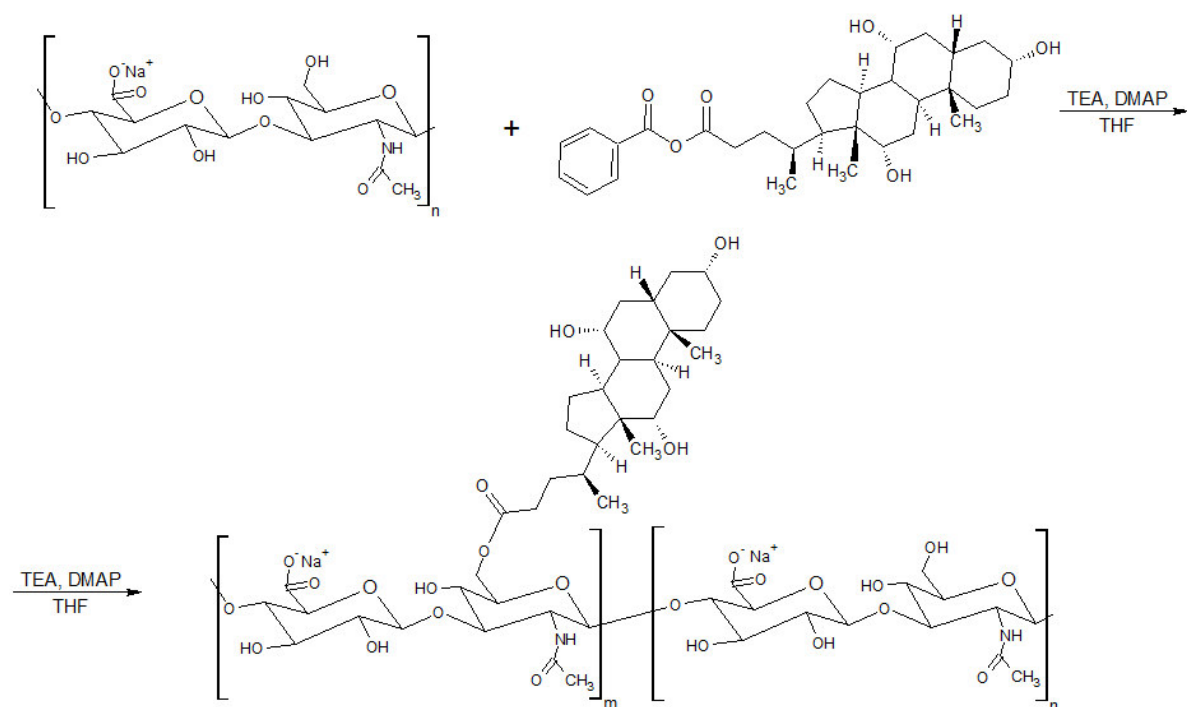
- Centrifúga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40R
- NMR spektrometer Bruker AvanceTM III 500 MHz
- Lyofilizátor Scanvac Coolsafe 55-9 Pro
- Sušiareň Venticell 111 Comfort
- Analytické váhy Helago HR-200
- Predvážky VIBRA
- IKA T25 Digital Ultra Turrax
- Reometer Malvern Kinexus Pro+
- Infračervený spektrometer Thermo Scientific Instruments NICOLET 6700 FT-IR
- UPLC Aquity waters s PDA detektorom
- Waters Aquity UPC2, SFC s PDA detektorom
- Alliance Waters s refraktometrickým detektorom a viskozimetrickým detektorom a detektorom s rozptylom svetla DAWN EOS
- Malvern Zetasizer Nano ZS (laser 633 nm)

4.3 Príprava HA očkovanej kyselinou cholovou

Pri syntéze derivátu kyseliny hyalurónovej o rôznom množstve a molekulovej hmotnosti boli použité rôzne ekvivalenty kyseliny cholovej a benzoylchloridu (Tabuľka 1). Použité množstvá všetkých reaktantov sú uvedené ako Príloha 2. Kyselina hyalurónová (dimér) bola rozpustená vo vode. Rôzne ekvivalenty kyseliny cholovej boli rozpustené v THF v samostatnej banke. Aktivovaná kyselina cholová bola pridaná do vodného roztoku HA. Prítomnosť THF v oboch roztokoch zabezpečila lepšiu homogenizáciu reakčného roztoku. Následne bol do oboch roztokov pridaný TEA. Po pridaní rôznych množstiev BC (podľa použitého ekvivalentu kyseliny cholovej) do roztoku kyseliny cholovej prebiehala aktivácia karboxylovej skupiny kyseliny cholovej po dobu 30 min za vzniku zmiešaného alifaticko-aromatického anhydridu (Obrázok 9). Do roztoku HA bolo pridané katalytické množstvo DMAP. Po aktivácii kyseliny cholovej bol jej roztok obsahujúci zmiešaný anhydrid pridaný do roztoku kyseliny hyalurónovej (Obrázok 10). Reakcia prebiehala 3 h pri laboratórnej teplote za mierného miešania, ktoré zvyšovalo homogenizáciu zložiek roztoku. Po reakcii bol produkt izolovaný zrážaním. Do zmesi bol pridaný presýtený roztok chloridu sodného, ktorý podporuje zrážanie. Následne bol pridaný IPA, v dôsledku čoho vznikla biela zrazenina, ktorá bola osemkrát premývaná. Derivát bol nakoniec oddelený dekantáciou a bol sušený v sušiarňi pri teplote 40°C počas 24 h.



Obrázok 9 Aktivácia kyseliny cholovej



Obrázok 10 Vznik cholátu kyseliny hyalurónovej

Tabuľka 1 Hodnoty M_w HA a množstvo HA a kyseliny cholovej použité na syntézu

derivát	M_w (HA) [kDa]	m(HA) [g]	ekv.(CA)	m(CA) [g]	derivát	M_w (HA) [kDa]	m(HA) [g]	ekv. (CA)	m(CA) [g]
KV-1	12,31	0,5	0,5	0,255	KV-9	12,31	0,5	0,2	0,204
KV-2		0,5	0,7	0,358	KV-10		0,5	0,4	0,255
KV-3		0,5	1	0,511	KV-11		2	0,4	0,817
KV-4		0,5	0,2	0,102	KV-12		5	0,4	2,04
KV-5		0,5	0,5	0,255	KV-13	97,31	10	0,4	4,09
KV-6		0,5	0,7	0,358	KV-14		3	0,4	1,53
KV-7		0,5	0,4	0,204	KV-15		3	0,4	1,84
KV-8		0,5	1	0,511	KV-16		3	0,4	2,15

4.4 NMR

4.4.1 1D NMR

Približne 8 mg pripraveného derivátu KV-1 až KV-13 bolo rozpustených v 800 μg D_2O a následne bolo na NMR spektrometri (Bruker AvanceTM III 500 MHz) namerané ^1H spektrum. V prípade vzoriek derivátov KV-14 až KV-16 s vyššou molekulovou hmotnosťou bolo rozpustených v D_2O približne 6 mg.

4.4.2 2D NMR

Pre meranie HSQC bolo rozpustených približne 10 mg derivátu KV-03 v 800 μl D_2O . V prípade DOSY bol tento derivát rozpustený v zmesi 800 μl D_2O a 100 μl dIPA.

4.5 FT-IR

Pre potreby merania infračerveného spektra bola pripravená zmes KBr s cholátom hyalurónanu v tuhom skupenstve. Zo zmesi boli následne lisovaním pripravené tablety derivátu KV-08. Tieto tablety boli analyzované na infračervenom spektrometri s Fourierovou transformáciou (Thermo Scientific Instruments NICOLET 6700 FT-IR). Meranie infračerveného spektra prebiehalo v rozsahu vlnových čísel 400 - 4000 cm^{-1} s počtom skenov 64. Rovnaký postup bol uplatnený aj pri meraní IR spektra HA a kyseliny cholevej.

4.6 Stanovenie molekulovej hmotnosti pomocou metódy SEC-MALLS

Chromatografický systém bol zložený z odplyňovača Agilent Model G 1379, pumpy Agilent HPLC Model G 1310, ručného injektora Rheodyne® Model 7125, dvoch kolón 7,8 mm Ultrahydrogel Linear (Waters). Systém zahŕňal chromatografické detektory: detektor DAWN EOS, ViscoStar diferenciálny viskozimeter a Optilab Rex diferenciálny difraktometer (Wyatt Technology, Santa Barbara, Kalifornia).

Injekčný objem roztoku HA pre analýzu bol 100 μl s koncentráciou 0,015-1 hm. %. Mobilná fáza bola tvorená vodným roztokom fosfátového pufru s koncentráciou 50 mM a 0,02% roztokom azidu sodného. Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Hodnota prírastku indexu lomu (dn/dc) použitá pre výpočet molekulovej hmotnosti a polydisperzity (M_w/M_n) HA a derivátov bola 0,155 $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$.

4.7 Reologická analýza

Z pripravených derivátov KV-13 až KV-16, ktoré sa od seba líšia molekulovou hmotnosťou, boli pripravené roztoky o celkovom objeme 5 ml. Pre každý derivát bol pripravený jeho 5% a 10% vodný roztok. Rovnaké množstvá derivátu boli rozpustené vo fyziologickom roztoku (0,9% vodný roztok NaCl). Pre porovnanie výsledkov meraní boli pripravené aj 5% roztoky kyseliny hyalurónovej použitej na jednotlivé syntézy derivátov. Viskozita pripravených roztokov bola meraná reometrom (Malvern Kinexus Pro +) pri teplote 25 $^{\circ}\text{C}$ s použitou geometriou kužel-doska. V dôsledku použitia tejto geometrie bol pre účely merania postačujúci objem 1 ml vzorky pre analýzu. Reologické meranie prebiehalo v rozsahu šmykových rýchlostí 0,1 až 1000 s^{-1} . Každé meranie viskozity roztoku bolo uskutočnené trikrát.

4.8 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS

Pre účely merania DLS boli pripravené 0,5 a 1% roztoky častíc cholátu kyseliny hyalurónovej so stupňom substitúcie približne 10 % (deriváty KV-07, KV-10) s enkapsulovaným kurkumínom alebo koenzýmom Q10 vo vode s celkovým objemom 5 ml. Do kyvety bol prenesený približne 1 ml zriedeného roztoku, kyveta bola umiestnená do prístroja na meranie DLS (Malvern Zetasizer Nano ZS) a následne bola zistená distribúcia veľkosti častíc a stupeň polydisperzity.

4.9 Stanovenie enkapsulovaného množstva pomocou SFC

Množstvo naviazanej aktívnej látky (kurkumín, koenzým Q10) bolo stanovené pomocou SFC. Roztoky aktívnej látky o koncentrácii $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a kofeínu o koncentrácii $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ boli použité ako vnútorné štandardy. Vzorky derivátov boli analyzované pri tlaku 1600 psi a prietoku $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ v kolóne (Waters Acquity UPC² Tours 2-PIC), $1,7 \mu\text{m}$. Gradient metanolu v oxide uhličitom sa pohyboval v rozmedzí 2 až 9 %, detekcia bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 372 nm. Polymérne micely obsahujúce RP boli rozpustené v zmesi vody a izopropanolu v pomere 1:4. Alikvotný podiel bol prefiltrovaný cez filter s veľkosťou pórov $0,22 \mu\text{m}$ a následne bol analyzovaný.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Očkovanie kyseliny cholovej na HA

Hydrofobizácia HA bola uskutočnená kyselinou cholovou, ktorá sa svojou chemickou štruktúrou zaraďuje medzi steroidné látky. Deriváty boli pripravené dvojkrokovou syntézou. V prvom kroku pri laboratórnej teplote počas 30 minút prebiehala aktivácia karboxylovej skupiny kyseliny cholovej pomocou benzoyl chloridu v prítomnosti TEA za vzniku zmiešaného alifaticko-aromatického anhydridu. V druhom kroku bol tento anhydrid prevedený bez izolácie k roztoku HA, trietylamínu a katalyzátoru DMAP v zmesi THF a vody (1:1). Esterifikácia prebiehala po dobu 3 hodín pri laboratórnej teplote. Výsledkom reakcie bol ester HA s kyselinou cholovou, ktorý bol následne charakterizovaný.

Reakcia prebiehala aj v prípade použitia HA s vyššou molekulovou hmotnosťou (KV-16, $M_w=319,3$), taktiež aj pri vyšších množstvách HA (KV-13, $m=10g$). Pri zvyšovaní molekulovej hmotnosti HA bolo pre dosiahnutie rovnakého stupňa substitúcie potrebné pridať väčšie množstvo kyseliny cholovej do reakčnej zmesi. Hodnoty molekulovej hmotnosti derivátu a odpovedajúce stupne substitúcie sú uvedené ako Tabuľka 2.

5.2 NMR

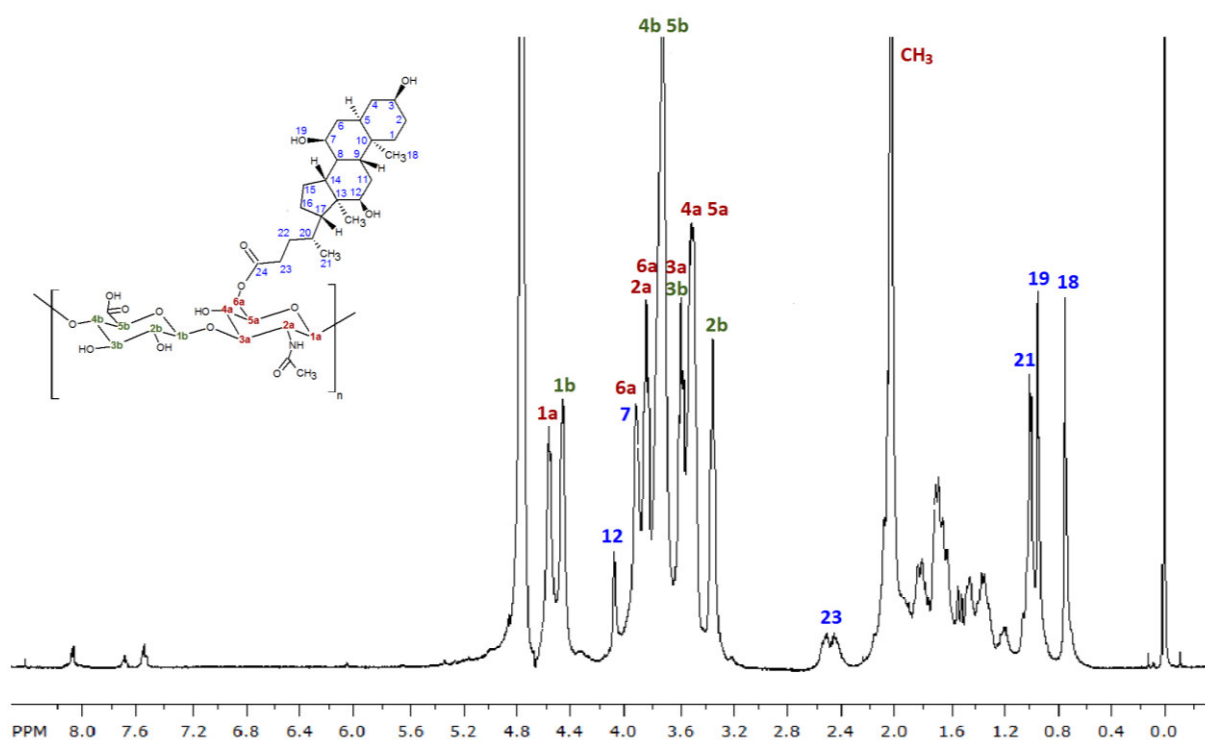
5.2.1 1H NMR

Vzniknutý derivát bol charakterizovaný pomocou 1H NMR spektroskopie. Výsledné 1H NMR spektrum derivátu kyseliny hyalurónovej (Obrázok 11) zobrazuje charakteristické rezonancie. Signály medzi 3,2-4 ppm označujú skelet kyseliny hyalurónovej, dublet medzi 4,4-4,6 ppm odpovedá vodíkom na uhlíku C1 skeletu. Pík v oblasti 2,0 ppm predstavuje $-CH_3$ skupinu N-acetylglukóзамínu. Píky v oblasti 1,3-1,8 ppm sú charakteristické pre steroidné jadro kyseliny cholovej. Zo získaných protónových spektier boli vypočítané stupne substitúcie (DS) jednotlivých derivátov. Pre výpočet bol použitý dublet anomérnych vodíkov hyaluronanu (4,4-4,6 ppm) a pík jedného z metylov kyseliny cholovej, konkrétne 0,6-0,8 ppm. Integráciou týchto píkov boli vypočítané stupne substitúcie, avšak pomer vodíkov pripadajúcich na jednotlivé píky je 2:3, v dôsledku čoho bolo potrebné kalibrovať hodnotu integrálu píku hyaluronanu na hodnotu 67. Stupeň substitúcie určuje koľko hydroxylových skupín je substituovaných na 100 disachardových jednotiek HA.

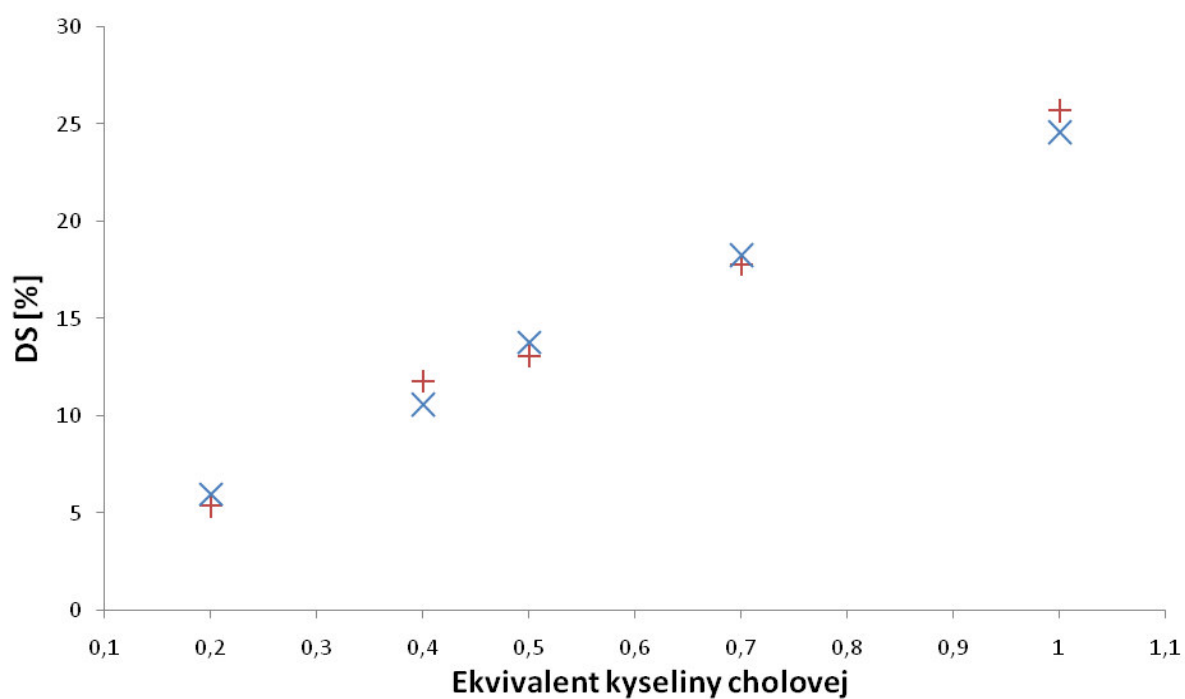
V prípade cholátu hyaluronanu bola skúmaná miera naviazania substituentu v závislosti na použitom ekvivalente kyseliny cholovej. Výsledné stupne substitúcie získané z protónových spektier znázorňuje Obrázok 12. Z tejto závislosti vyplýva, že stupeň substitúcie rastie na intervale od 0,2 do 1 lineárne. Opakovaním syntéz bola potvrdená ich reprodukovateľnosť.

Tabuľka 2 Hodnoty DS odpovedajúce M_w (derivátu) a použitému ekv. kyseliny cholovej

derivát	M_w (der.) [kDa]	ekv. (CA)	DS[%]	derivát	M_w (der.) [kDa]	ekv. (CA)	DS[%]
KV-1	18,15	0,5	13,1	KV-9	18,15	0,2	6,0
KV-2	18,15	0,7	17,8	KV-10	18,15	0,4	10,6
KV-3	18,15	1	25,7	KV-11	18,15	0,4	10,8
KV-4	18,15	0,2	5,4	KV-12	18,15	0,4	10,7
KV-5	18,15	0,5	13,8	KV-13	18,15	0,4	11,2
KV-6	18,15	0,7	18,3	KV-14	113,0	0,4	11,0
KV-7	18,15	0,4	11,8	KV-15	191,8	0,4	9,9
KV-8	18,15	1	24,6	KV-16	319,3	0,4	11,4



Obrázok 11 ^{11}H NMR spektrum derivátu



Obrázok 12 DS pre rôzne ekv. kyseliny cholevej (deriváty KV-1 až KV-10)

5.2.2 HSQC

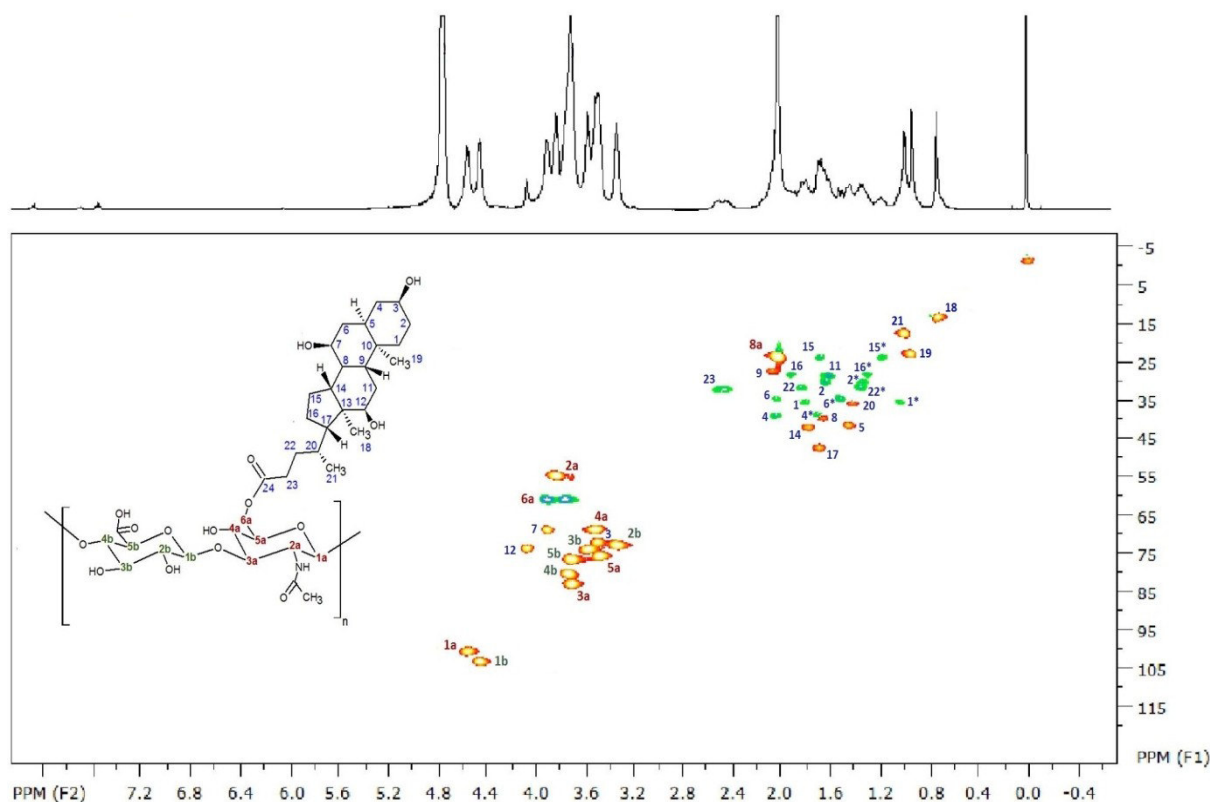
Keďže v protónovom spektre derivátu (Obrázok 11) sú niektoré signály kyseliny cholevej prekryté signálmi patriacimi HA (Obrázok 7), bolo použité HSQC spektrum na priradenie všetkých protónových rezonancií esterifikovaného derivátu (Obrázok 13). Podľa HSQC spektra je možné odlišiť skupiny s nepárnym počtom vodíkov (CH_3 , CH), od skupín s počtom párnym (CH_2). Skupiny CH_3 a CH sú znázornené v HSQC spektre zelenou farbou, oranžovou sú skupiny CH_2 .

5.2.3 DOSY

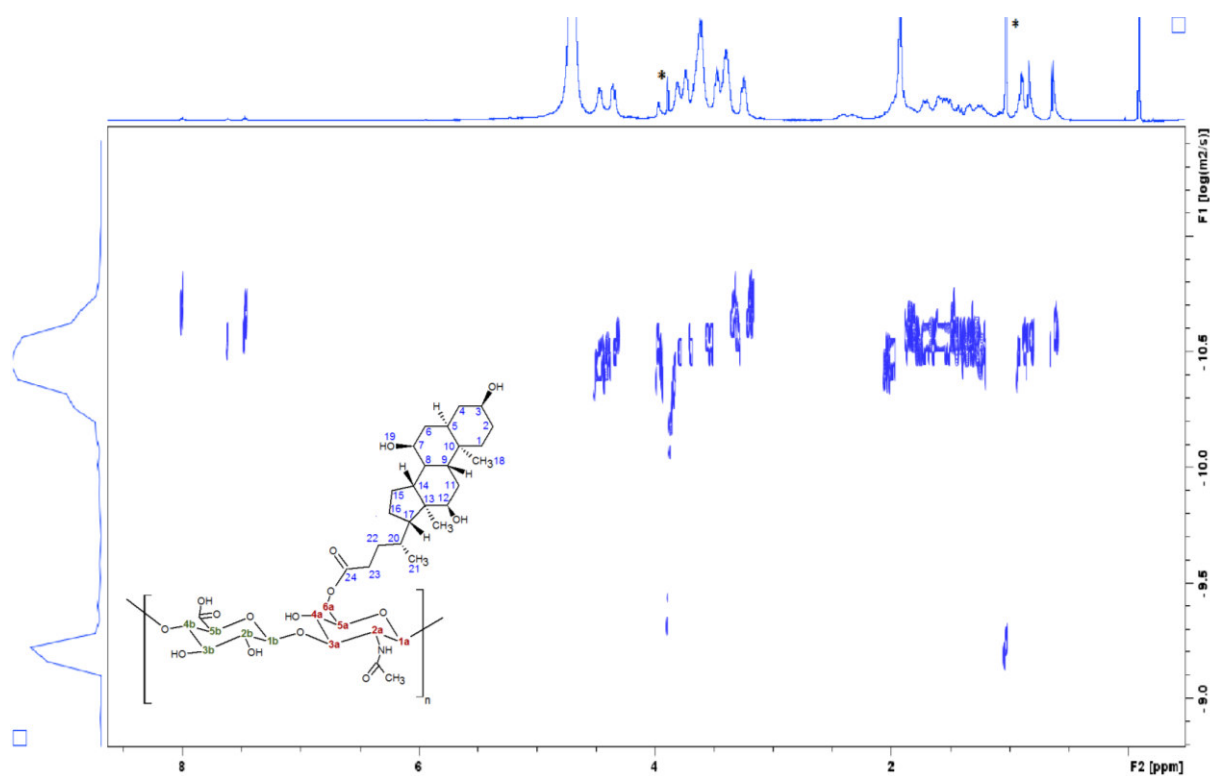
Vytvorenie väzby medzi kyselinou cholovou a kyselinou hyalurónovou bolo potvrdené pomocou DOSY experimentu. DOSY spektrum derivátu (Obrázok 14) zobrazuje rovnaké difúzne správanie pre všetky signály, z čoho vyplýva, že signály protónového NMR v tejto oblasti patria jednému štruktúrnemu komplexu (cholát kyseliny hyalurónovej).

5.3 FT - IR

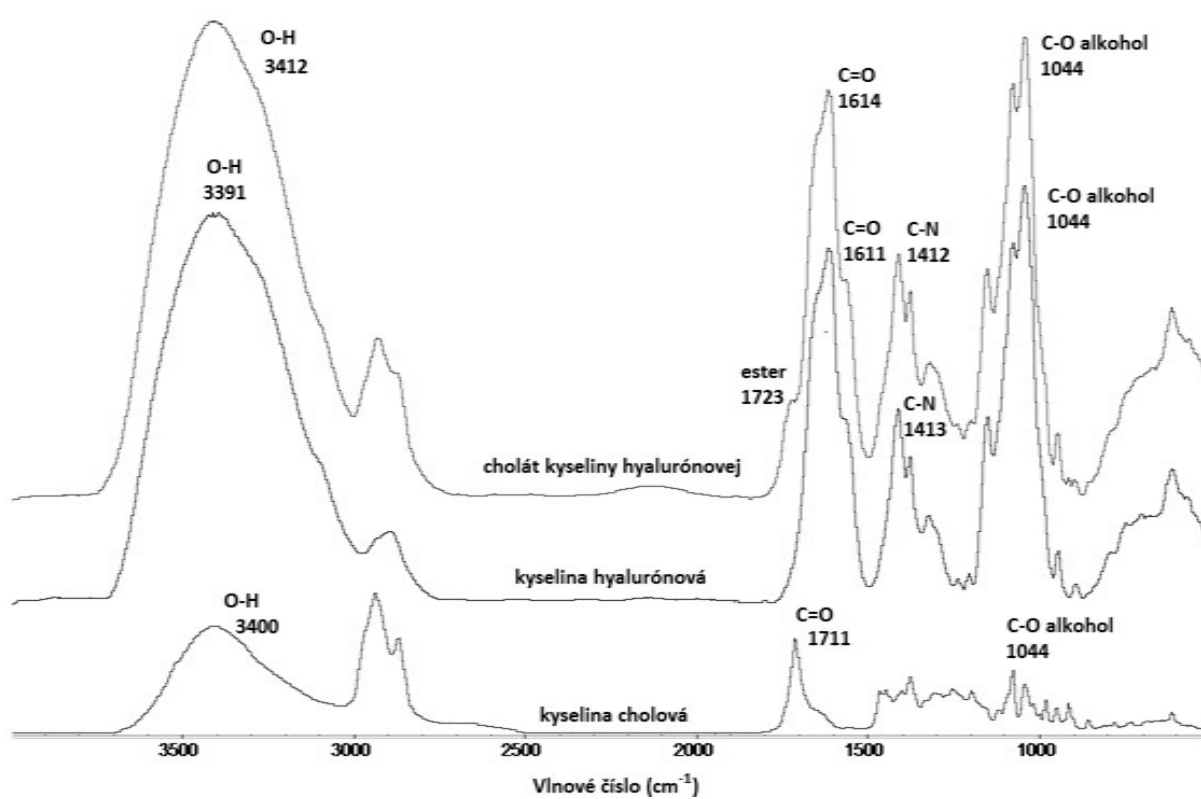
Rovnako ako NMR spektrá, aj infračervené spektrum derivátu potvrdzuje vytvorenie kovalentnej väzby medzi kyselinou hyalurónovou a kyselinou cholovou. Spektrum (Obrázok 15) obsahuje veľa charakteristických signálov hyalurónanu a niektoré signály kyseliny cholevej. Vo všetkých troch spektrách v oblasti vlnových čísel približne 3400 cm^{-1} nájdeme signály charakteristické pre $-\text{OH}$ skupiny, vlnové čísla v rozmedzí $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ odpovedajú $\text{C}=\text{O}$ skupine. Píky 1412 cm^{-1} (derivát) a 1413 cm^{-1} (HA) charakterizujú väzbu $\text{C}-\text{N}$, čo dokazuje prítomnosť N-acetylglukóзамínu v oboch štruktúrach. Pík, ktorý potvrdzuje vytvorenie kovalentnej esterovej väzby medzi kyselinou cholovou a kyselinou hyalurónovou sa nachádza pri vlnovom čísle 1723 cm^{-1} a odpovedá esterovej skupine.



Obrázok 13 HSQC spektrum derivátu



Obrázok 14 DOSY spektrum derivátu



Obrázok 15 FT-IR spektrum kyseliny hyaluronovej, kyseliny cholinej a cholátu kyseliny hyaluronovej

5.4 SEC-MALLS

Výsledky vylučovacej chromatografie (Tabuľka 3) ukazujú nárast molekulovej hmotnosti derivátu v porovnaní s molekulovou hmotnosťou východiskovej kyseliny hyalurónovej. Z tejto analýzy vyplýva, že počas procesu modifikácie nedošlo k degradácii kyseliny hyalurónovej. Pozorovaný nárast súvisí s agregáciou polysacharidu a v dôsledku toho aj s rozdielnymi interakciami s kolónou použitou na stanovenie. Výsledky merania sú uvedené spolu s hodnotami stupňov substitúcie derivátu a ekvivalentom kyseliny cholovej použitej na syntézu derivátov (Tabuľka 3). Z hodnôt ekvivalentu kyseliny cholovej, stupňa substitúcie derivátu a nameranej molekulovej hmotnosti kyseliny hyalurónovej je zrejmé, že so stúpajúcou molekulovou hmotnosťou kyseliny hyalurónovej použitej na syntézu je potrebné do reakcie pridať väčšie množstvo kyseliny cholovej, (zvyšujeme ekvivalent kyseliny cholovej) pokiaľ chceme aby vzniknutý derivát o rôznych molekulových hmotnostiach mal približne rovnaký stupeň substitúcie.

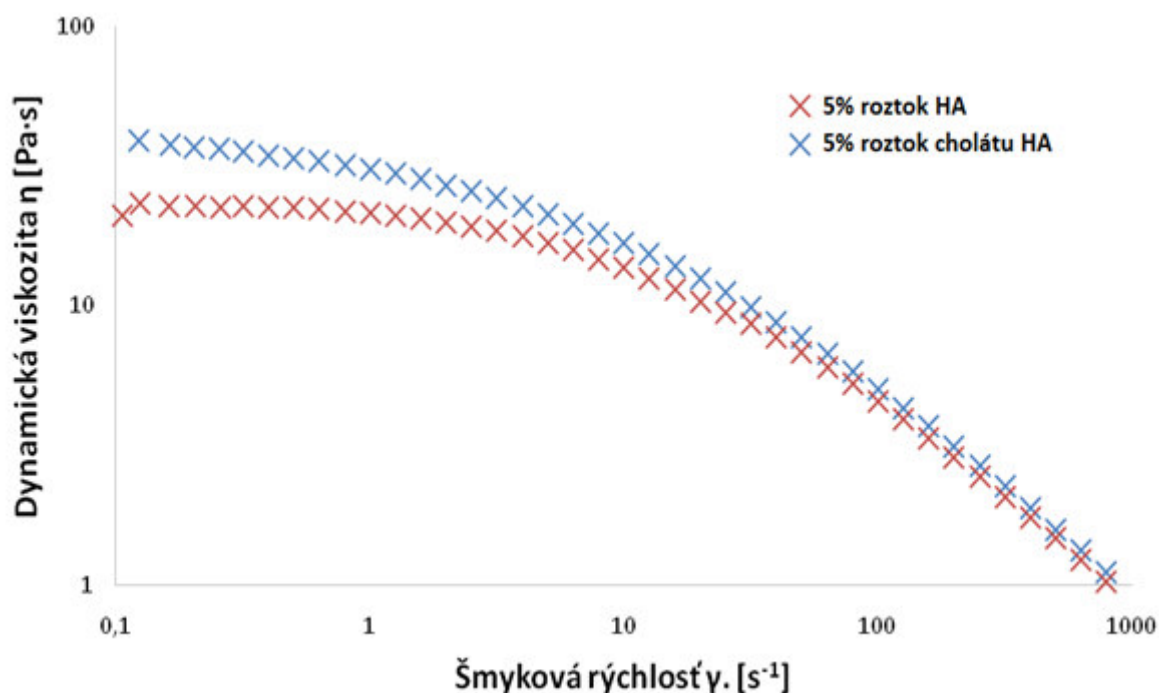
Tabuľka 3 Namerané hodnoty molekulovej hmotnosti a stupňa polydisperzity derivátu a HA

Derivát		Vstupná HA				
názov	ekv. CA	DS [%]	M _w [kDa]	PDI	M _w [kDa]	PDI
KV-13	0,4	11,2	18,15	1,294	12,31	2,288
KV-14	0,5	11,1	113,0	1,204	97,31	1,438
KV-15	0,6	9,9	191,8	1,195	167,4	1,284
KV-16	0,7	11,4	332,8	1,645	319,3	2,143

Okrem molekulovej hmotnosti boli pomocou vylučovacej chromatografie určené aj hodnoty stupňa polydisperzity. Namerané hodnoty stupňa polydisperzity v prípade derivátov KV-13 a KV-16 sú väčšie ako hodnota odpovedajúca monodisperznému systému (PDI=1). Takýto polydisperzný systém je však pre sacharidy obvyklý. V prípade derivátov KV-14 a 15 bola distribúcia molekulových hmotností nižšia v dôsledku nižšieho stupňa polydisperzity.

5.5 Reologická analýza

Reologická analýza bola použitá na zistenie závislosti dynamickej viskozity roztokov derivátu a kyseliny hyalurónovej na šmykovej rýchlosti v intervale od 0,1 do 1000 s⁻¹. Obrázok 16 zobrazuje vzťah medzi viskozitou 5% roztoku hyalurónanu v porovnaní s 5% roztokom derivátu (KV-16), oba vo fyziologickom prostredí (0,9% vodný roztok NaCl). V oblasti nižších šmykových rýchlostí 0,1-1 s⁻¹ je dynamická viskozita roztoku kyseliny hyalurónovej takmer konštantná, v prípade derivátu mierne klesá. So zvyšujúcou sa šmykovou rýchlosťou dochádza k deformácii roztokov a viskozita roztokov derivátu aj kyseliny hyalurónovej značne klesá. Takýto priebeh závislosti dynamickej viskozity na šmykovej rýchlosti potvrdzuje neneutronovské správanie HA a jej derivátu. Na základe nameranej závislosti dynamickej viskozity na šmykovej rýchlosti je možné povedať, že v oblasti nižších šmykových rýchlostí je roztok vzniknutého derivátu viskóznejší v porovnaní so vstupnou kyselinou hyalurónovou použitou na jeho syntézu, a preto nedošlo k degradácii v priebehu reakcie.



Obrázok 16 Vzťah medzi dynamickou viskozitou a šmykovou rýchlosťou HA a derivátu HA

5.6 DLS

Vybrané deriváty s optimálnym stupňom substitúcie (DS=10%) boli použité ako nosiče nepolárnych látok. Na pripravený cholát kyseliny hyaluronovej bol pomocou nekovalentných interakcií naviazaný koenzým Q10 alebo kurkumín. Z týchto komplexov boli pripravené 0,5 a 1% roztoky vo vode, v prípade ktorých bola pomocou metódy DLS meraná veľkosť častíc. Hodnoty veľkosti častíc a stupne polydisperzity sú uvedené ako Tabuľka 4. Nameraná veľkosť častíc komplexov s naviazaným koenzýmom Q10 bola o niečo vyššia v porovnaní s veľkosťou častíc v prípade naviazaného kurkumínu. V oboch prípadoch sa táto veľkosť nachádzala v oblasti stoviek nm. Hodnoty stupňov polydisperzity boli určené aj v prípade DLS. Roztoky častíc kurkumínu enkapsulovaného derivátom vykazovali menšie hodnoty PDI (monodisperzný systém, PDI=0) ako častice s enkapsulovaným koenzýmom Q10.

Tabuľka 4 Výsledky meraní dynamického rozptylu svetla (DLS)

w(derivát) [%]	derivát	koenzým Q10		kurkumín	
		Z-Ave [nm]	PDI	Z-Ave [nm]	PDI
0,5	KV-07	318,9	0,238	293,6	0,121
1	KV-07	316,8	0,223	306,5	0,117
0,5	KV-10	305,7	0,194	274,2	0,132
1	KV-10	300,5	0,204	275,8	0,138

5.7 SFC

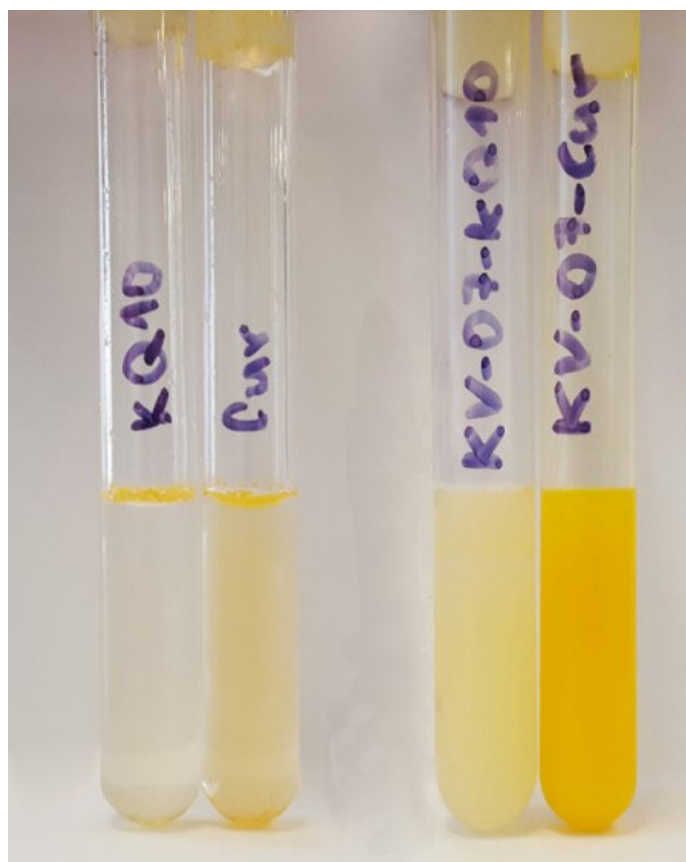
Derivát je schopný naviazať do nanoagregátov viac ako dvojnásobné množstvo koenzýmu Q10 v porovnaní s kurkumínom. Rozdielnú rozpustnosť koenzýmu Q10 a kurkumínu vo vode v porovnaní s rozpustnosťou ich komplexov s pripraveným derivátom (KV-07 a KV-10) vo vode znázorňuje Obrázok 17. Tento experiment potvrdil predpoklad, že dochádza k enkapsulácii hydrofóbných látok amfifílnym derivátom, v dôsledku čoho sú komplexy vo vode dobre rozpustné, aj keď samotné látky sa vo vode nerozpúšťajú. Pomocou superkritickej fluidnej chromatografie bolo zistené enkapsulované množstvo kurkumínu a koenzýmu Q10, výsledky chromatografickej analýzy uvádza Tabuľka 5.

Tabuľka 5 Množstvá naviazaného koenzýmu Q10 a kurkumínu na vybrané deriváty

derivát	koenzým Q10 [hm. %]	kurkumín [hm. %]
KV-07	10,65	3,38
KV-10	10,83	4,27

Výskum zaoberajúci sa prípravou polymérnych micel Kolliphor® HS 15 uvádza enkapsulované množstvo koenzýmu Q10 do micel približne 14 hm. %. Toto množstvo je o niečo vyššie než množstvo koenzýmu Q10 enkapsulované do micel tvorených cholátom hyaluronanu (HA-CA) (Tabuľka 5, približne 11 hm. %) [32].

Iná výskumná skupina pripravovala micely na báze monometyl poly(etylénglykol)-poly(ϵ -kaprolaktónu), do ktorých bolo možné enkapsulovať približne 15 hm. %. V porovnaní s micelami HA-CA (Tabuľka 5, približne 4 hm. %) je enkapsulované množstvo do MPEG-PCL micel oveľa vyššie [33].



Obrázok 17 Rozpustnosť koenzýmu Q10 a kurkumínu vo vode (vľavo), rozpustnosť komplexu derivátu s enkapsulovaným koenzýmom Q10 a kurkumínom (vpravo)

6 ZÁVER

Táto práca bola zameraná na vytvorenie silne hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyalurónovej esterifikáciou s kyselinou cholovou. Vzniknutý derivát so stupňom substitúcie približne 10 % bol použitý ako nosič, a preto doň boli enkapsulované nepochybné látky.

V teoretickej časti boli popísané modifikácie HA, spôsob prípravy amfifilného derivátu, jeho využitia a látky použité na modifikáciu. Popísané boli aj metódy, ktorými bol derivát charakterizovaný.

Praktická časť sa zaoberala optimalizáciou syntézy cholátu kyseliny hyalurónovej. Boli pripravené deriváty s rôznym stupňom substitúcie, molekulovou hmotnosťou a v rôznom množstve. Deriváty boli následne charakterizované pomocou spektrálnych metód ako sú NMR a FT-IR, čím bola potvrdená ich štruktúra. Následne bola zistená metódou SEC-MALLS molekulová hmotnosť. Molekulová hmotnosť derivátu bola očividne väčšia ako molekulová hmotnosť kyseliny hyalurónovej použitej na syntézu príslušných derivátov. Ďalej bol derivát podrobený reologickej analýze, z čoho vyplýva, že viskozita derivátu je podobná alebo vyššia v porovnaní s kyselinou hyalurónovou. Výsledky vylučovacej chromatografie a reologickej analýzy teda potvrdzujú vznik agregátov hydrofobizovaného derivátu vo fyziologickom prostredí. Deriváty s optimálnym stupňom substitúcie (približne 10 %) boli použité v oblasti nosičov. Metódou DLS bola zistená veľkosť pripravených častíc, ktorá je cca 300 nm. Do nepochybného jadra agregátov bolo možné enkapsulovať lipofilné látky, a preto bola zistená enkapsulačná účinnosť derivátu chromatografickými metódami. Enkapsulovanými látkami bol koenzým Q10 a kurkumín. Bolo zistené, že pripravený derivát dokáže naviazať koenzým Q10 a kurkumín do nanoagregátov, pričom množstvo enkapsulovaného koenzýmu Q10 je viac ako dvojnásobné v porovnaní s kurkumínom.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] MATTHEOLABAKIS, George, Lara MILANE, Amit SINGH a Mansoor M. AMIJL. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *Journal of Drug Targeting*. 2015, **23**(7-8), 605-618. DOI: 10.3109/1061186X.2015.1052072. ISSN 1061-186x.
- [2] VAFAEI, Seyed Yaser, Motahareh ESMAEILI, Mohsen AMINI, Fatemeh ATYABI, Seyed Naser OSTAD a Rassoul DINARVAND. Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa. *Carbohydrate Polymers*. 2016, (144), 371-381.
- [3] HUERTA-ANGELES, Gloria, Martin BOBEK, Eva PŘÍKOPOVÁ, Daniela ŠMEJKALOVÁ a Vladimír VELEBNÝ. Novel synthetic method for the preparation of amphiphilic hyaluronan by means of aliphatic aromatic anhydrides. *Carbohydrate Polymers*. 2016, (111), 883-891.
- [4] CHOI, Ki Young, Gurusamy SARAVANAKUMAR, Jae Hyung PARK a Klinam PARK. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, (99), 82-94.
- [5] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2011, **85**(3), 469-489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019. ISSN 01448617.
- [6] MOLLIARD, Samuel Gavard, Séverine ALBERT a Karine MONDON. Key importance of compression properties in the biophysical characteristics of hyaluronic acid soft-tissue fillers. *Key importance of compression properties in the biophysical characteristics of hyaluronic acid soft-tissue fillers*. 2016, (61), 290-298.
- [7] LAI, Zee-Wei, Raha Abdul RAHIM, Arbakariya B. ARIFF a Rosfarizan MOHAMAD. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 114(3), 286-291. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.04.011. ISSN 13891723.
- [8] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2012. Vysoké učení technické v Brně.
- [9] BELLINI, Davide a Alessandra TOPAI. *Amides d'acide hyaluronique, derives de ce dernier et leurs procede de preparation*. 1999. WO2000001733 A1.
- [10] HU, Meng-Xin, Ji-Nian LI, Shi-Lin ZHANG, Liang LI a Zhi-Kang XU. Hydrophilic modification of PVDF microfiltration membranes by adsorption of facial amphiphile cholic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, (123), 809-813.
- [11] NIU, Xiaofang, Dan LUO, Rui CHEN, Fei WANG, Xiaowei SUN a Haitao DAI. Optical biosensor based on liquid crystal droplets for detection of cholic acid. *Optics Communications*. 2016, **381**, 286-291. DOI: 10.1016/j.optcom.2016.07.016. ISSN 00304018.
- [12] ZÍGOLO, M. Antonela, Guadalupe GARCÍA LIÑARES a Alicia BALDESSARI. New cholic acid derivatives: Biocatalytic synthesis and molecular docking study. *Steroids*. 2016, **107**, 10-19. DOI: 10.1016/j.steroids.2015.12.014. ISSN 0039128.
- [13] DONG, Xuemeng a Chenguang LIU. Preparation and Characterization of Self-Assembled Nanoparticles of Hyaluronic Acid-Deoxycholic Acid Conjugates. *Journal of Nanomaterials*. 2010, **2010**, 1-9. DOI: 10.1155/2010/906936. ISSN 1687-4110.

- [14] PALUMBO, Fabio Salvatore, Giovanna PITARRESI, Delia MANDRACCHIA, Giuseppe TRIPODO a Gaetano GIAMMONA. New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*. 2006, **66**(3), 379-385. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.03.023. ISSN 01448617.
- [15] SHARMA, Varsha, Sundaramurthy ANANDHAKUMAR a Manickam SASIDHARAN. Self-degrading niosomes for encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs: An efficient carrier for cancer multi-drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, **56**, 393-400. DOI: 10.1016/j.msec.2015.06.049. ISSN 09284931
- [16] CROY, S. a G. KWON. Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, **12**(36), 4669-4684. DOI: 10.2174/138161206779026245. ISBN 10.2174/138161206779026245. ISSN 13816128
- [17] ODA, Caroline Mari Ramos, Renata Salgado FERNANDES, Sávia Caldeira DE ARAÚJO LOPES, et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nanomicelles as a platform for tumor delivering. *Biomedicine*. 2017, **89**, 268-275. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.144. ISSN 07533322.
- [18] CHOI, Ki Young, Hyunjin CHUNG, Kyung Hyun MIN, Hong Yeol YOON, Kwangmeyung KIM, Jae Hyung PARK, Ick Chan KWON a Seo Young JEONG. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*. 2010, **31**(1), 106-114. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.030. ISSN 01429612.
- [19] NAZARI-VANANI, R., L. MOEZI a H. HELI. In vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system for curcumin. *Biomedicine*. 2017, **88**, 715-720. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.102. ISSN 07533322.
- [20] CHEUK, Sherwin Y., Frederick F. SHIH, Elaine T. CHAMPAGNE, Kim W. DAIGLE, James A. PATINDOL, Christopher P. MATTISON a Stephen M. BOUE. Nano-encapsulation of coenzyme Q10 using octenyl succinic anhydride modified starch. *Food Chemistry*. 2015, **174**, 585-590. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.031. ISSN 03088146.
- [21] MLYNÁRIK, Vladimír. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*. 2016, , -. DOI: 10.1016/j.ab.2016.05.006. ISSN 00032697
- [22] RIEGEL, Susanne D. a Garrett M. LESKOWITZ. Benchtop NMR spectrometers in academic teaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **83**, 27-38. DOI: 10.1016/j.trac.2016.01.001. ISSN 01659936.
- [23] SINGH, Kawarpal a Bernhard BLÜMICH. NMR spectroscopy with compact instruments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **83**, 12-26. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.014. ISSN 01659936.
- [24] PELUSI, Angela, Yutaka HANAWA, Hiroya ARAIE, Iwane SUZUKI, Mario GIORDANO a Yoshihiro SHIRAIWA. Rapid detection and quantification of haptophyte alkenones by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Algal Research*. 2016, **19**, 48-56. DOI: 10.1016/j.algal.2016.07.006. ISSN 22119264.
- [25] PALO, Mirja, Karin KOGERMANN, Natalja GENINA, Daniela FORS, Jouko PELTONEN, Jyrki HEINÄMÄKI a Niklas SANDLER. Quantification of caffeine and loperamide in printed formulations by infrared spectroscopy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016, **34**, 60-70. DOI: 10.1016/j.jddst.2016.02.007. ISSN 17732247.

- [26] SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. *Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS*. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005. ISBN 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005.
- [27] PIROK, Bob W.J., Pascal BREUER, Serafine J.M. HOPPE, et al. Size-exclusion chromatography using core-shell particles. *Journal of Chromatography A*. 2017, **1486**, 96-102. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.12.015. ISSN 00219673
- [28] MALKIN, Alexander Ya. a Avraam ISAYEV. INTRODUCTION: RHEOLOGY. *Rheology*. Elsevier, 2017, , 1. DOI: 10.1016/B978-1-927885-21-5.50006-0. ISBN 9781927885215.
- [29] CHANDRA, Richa, Birgit MELLIS, Kyana GARZA, Samee A. HAMEED, James M. JURICA, Ana V. HERNANDEZ, Mia N. NGUYEN a Chandra K. MITTAL. Remnant lipoprotein size distribution profiling via dynamic light scattering analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2016, **462**, 6-14. DOI: 10.1016/j.cca.2016.08.012. ISSN 00098981.
- [30] TAN, Qi, Jun FAN, Ruiqi GAO, Rujian HE, Tai WANG, Yaomou ZHANG a Weiguang ZHANG. Stereoselective quantification of triticonazole in vegetables by supercritical fluid chromatography. *Talanta*. 2017, **164**, 362-367. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.08.077. ISSN 00399140.
- [31] PFEIFER, Isabella, Adele MURAUER a Markus GANZERA. Determination of coumarins in the roots of *Angelica dahurica* by supercritical fluid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **129**, 246-251. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.014. ISSN 07317085.
- [32] LIU, Li, Kai MAO, Wenting WANG, Hongchun PAN, Fen WANG, Min YANG a Hong LIU. Kolliphor® HS 15 Micelles for the Delivery of Coenzyme Q10: Preparation, Characterization, and Stability. *AAPS PharmSciTech*. 2016, **17**(3), 757-766. DOI: 10.1208/s12249-015-0399-5. ISSN 1530-9932.
- [33] LIU, Lei, Lu SUN, Qinjie WU, et al. Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **443**(1-2), 175-182. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.12.032. ISSN 03785173.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Použitá skratka	Vysvetlenie skratky
BC	Benzoylchlorid
BDDE	Butándiol-diglycidyléter
CDMT	2-chlór-dimetoxy-1,3,5-triazín
CMPI	2-chlór-1-metylpyridíniumjodid
COSY	Correlation Spectroscopy
DCC	N,N-dicyklohexylkarboimid
DLS	Dynamic Light Scattering
DMAP	4-(dimethylamino)pyridín
DMF	Dimetylformamid
DMSO	Dimetylsulfoxid
DOCA	Kyselina deoxycholová
DOCA-NH ₂	N-deoxycholo-etylendiamín
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DS	Stupeň substitúcie
EDC	1-etyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl] karbodiimid
FT-IR	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
HA	Kyselina hyalurónová
HA-CA	Cholát kyseliny hyalurónovej
HNS	N-hydroxysukcínimid
HSQC	Heteronuclear Quantum Coherence
NMM	N-metylmorfolínium
NMR	Nukleárna Magnetická Rezonancia
OSA	Oktenyl anhydrid kyseliny jantárovej
PDI	Stupeň polydisperzity
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography with Multi Angle Laser Light Scattering
SFC	Supercritic Fluid Chromatography
TBA	Tetrabutylamóniová soľ
TEA	Trietylamin
THF	Tetrahydrofurán

Použitý symbol	Vysvetlenie symbolu
r_h	Hydrodynamický polomer častice
k_B	Boltzmanova konštanta
T	Termodynamická teplota
π	Ludolfovo číslo
η	Dynamická viskozita
D	Difúzny koeficient

9 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1 Možnosti modifikácie HA

Príloha 2 Množstvá reaktantov použitých na syntézu derivátov HA-CA

10 PRÍLOHY

Príloha 1 Možnosti modifikácie HA

Cieľová oblasť HA	Typ reakcie	Aktivátor	Reaktanty	Rozpúšťadlo
COOH	Amidácia	Karboimid	EDC, NHS	Voda (pH 4,75-7,5) alebo DMSO
		CMPI	CMPI, TEA	DMF alebo DMSO
		CDMT	CDMT, NMM	Voda/ acetonitril
		1,1'-karbonyl-diimidazol	1,1'-karbonyl-diimidazol	DMSO
	Esterifikácia	Diazometán	Trimetylsilyl diazometán, kyselina octová	DMSO
		Alkyl halogenidy	Alkyl jodid alebo bromid	DMSO
		Tetraetylén glykol tosylát	Tetraetylén glykol tosylát	DMSO
		Bisepoxidy	Butándiol-diglycidyl éter	Voda (kyselina octová, pH 2-5)
	Oxidácia	Jodistan sodný	Jodistan sodný	Voda
OH	Tvorba éterov	Bisepoxidy	1,2,3,4-diepoxybután	Voda (0,2 M NaOH, pH > 13)
			Butándiol(diglycidyl)éter	Voda (0,25 M NaOH, pH > 13)
			Etyléndiglykol diglycidyl éter a polyglycerol polyglycidyl éter	Voda (1 M NaOH, pH 14)
			Epichlórhydrín alebo diepoxyoktán	Voda (pH 10 alebo pH 4)
		Divinyl sulfón	Divinyl sulfón	Voda (0,2 M NaOH, pH > 13)
		Etylénsulfid	Etylénsulfid, DTT	Voda (pH 8,5-10)
	Tvorba hemiacetálov	Glutaraldehyd	Glutaraldehyd	Voda (pH 2)
	Esterifikácia	Alkyljantárové anhydridy	Oktenyl anhydrid jantárovej kyseliny	Voda (pH 9)
		Karboxylát aktivovaný Acyl-chloridom	-	DMSO
		Anhydrid metakrylovej kyseliny	-	Voda (pH 8-10)
	Tvorba karbamátov	Brómkyán	-	Voda (pH 9-10)
NHCOCH ₃	Deacetylácia/ Amidácia	Hydrazín sulfát	-	Voda, následne DMSO

Príloha 2 Množstvá reaktantov použitých na syntézu derivátov HA-CA

derivát	M _w (HA) [kDa]	m(HA) [g]	ekv. (CA) [-]	m(CA) [g]	V _{CA} (TEA) [ml]	V _{HA} (TEA) [ml]	m _{HA} (DMAP) [mg]	V _{CA} (BC) [ml]	V _{CA} (THF) [ml]	V _{HA} (THF) [ml]	V _{HA} (H ₂ O) [ml]	m(NaCl) [g]
KV-1	12,31	0,5	0,5	0,255	0,523	0,523	8	0,073	5	5	10	0,365
KV-2	12,31	0,5	0,7	0,358	0,523	0,523	8	0,102	5	5	10	0,365
KV-3	12,31	0,5	1	0,511	0,523	0,523	8	0,145	5	5	10	0,365
KV-4	12,31	0,5	0,2	0,102	0,523	0,523	8	0,029	5	5	10	0,365
KV-5	12,31	0,5	0,5	0,255	0,523	0,523	8	0,073	5	5	10	0,365
KV-6	12,31	0,5	0,7	0,358	0,523	0,523	8	0,102	5	5	10	0,365
KV-7	12,31	0,5	0,4	0,204	0,523	0,523	8	0,058	5	5	10	0,365
KV-8	12,31	0,5	1	0,511	0,523	0,523	8	0,145	5	5	10	0,365
KV-9	12,31	0,5	0,2	0,102	0,523	0,523	8	0,029	5	5	10	0,365
KV-10	12,31	0,5	0,4	0,204	0,523	0,523	8	0,058	5	5	10	0,365
KV-11	12,31	2	0,4	0,817	2,091	2,091	31	0,232	20	20	40	1,461
KV-12	12,31	5	0,4	2,043	5,227	5,227	76	0,581	50	50	100	3,653
KV-13	12,31	10	0,4	4,086	10,46	10,46	153	1,162	100	100	200	7,305
KV-14	97,31	3	0,5	1,532	3,136	3,136	46	0,436	30	30	60	2,192
KV-15	167,4	3	0,6	1,839	3,136	3,136	46	0,523	30	30	60	2,192
KV-16	319,3	3	0,7	2,145	3,136	3,136	46	0,61	30	30	60	2,192